

**Untersuchungen zur Abhängigkeit verschiedener
Aktivierungsmechanismen glatter Muskulatur
(*Taenia coli* des Meerschweinchens)
von der extrazellulären Kalzium-Konzentration
und vom Kalzium-Antagonisten Iproveratril**

Folker Dörfler

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556029_0047

Aus dem Physiologischen Institut der Universität
München

Direktor: Professor Dr.med.K.Kramer

Untersuchungen zur Abhängigkeit verschiede-
ner Aktivierungsmechanismen glatter
Muskulatur (Taenia coli des Meerschwein-
chens) von der extrazellulären Kalzium-
Konzentration und vom Kalzium-Antago-
nisten Iproveratril

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Folker Dörfler

aus

Homberg

Jahr

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Priv.Doiz.Dr.med.G.Ulbrecht

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med.K.Kramer

Dekan : Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.1974



Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Methodik	13
Ergebnisse	
1. Spontanverhalten in Normallösung	16
2. Spontanverhalten bei verschiedenen extrazellulären $[Ca^{++}]$	16
3. Zeitverlauf der Iproveratril-Hemmung	20
4. Einfluß von Iproveratril auf die Spontanaktivität	21
5. Spontanverhalten bei verschiedenen extrazellulären $[Ca^{++}]$ und konstanter [Iproveratril]	22
6. Ca^{++} - und Iproveratrilwirkung auf die phasische Kontraktion	26
7. Ca^{++} - und Iproveratrilwirkung auf den phasischen und den tonischen Teil der Kontraktion	30
8. Temperaturabhängigkeit induzierter Kontraktionen	42
9. ACh-Wirkung auf die durch K^+ depolarisierten Taenienstreifen	46
10. Abhängigkeit der ACh-bedingten Zusatzkontraktur von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$	47
Diskussion	51
Zusammenfassung	63
Literaturverzeichnis	66
Lebenslauf	75

Abkürzungen

AM	= Aktivierungsmechanismus
AP	= Aktionspotential
ATP	= Adenosintriphosphat
ECR	= Extrazellulärraum
e.c.	= extrazellulär
ED	= effektive Dosis
ICR	= Intrazellulärraum
i.c.	= intrazellulär
Ip	= Iproveratril
MP	= Membranpotential
SR	= sarkoplasmatisches Retikulum
s_x	= Standardabweichung
T-System	= System der transversalen Tubuli
x	= Mittelwert

Einleitung

Es besteht heute Übereinstimmung darüber, daß der elementare Kontraktionsvorgang in seinem Mechanismus und seiner Abhängigkeit vom ionalen Milieu in verschiedenen Vertebratenmuskeln (Skelett-, Herz- und glatte Muskulatur) prinzipiell gleichartig abläuft. Längenänderungen der kleinsten kontraktilen Einheiten - der Fibrillen - erfolgen dadurch, daß die dicken Myosin- an den dünnen Aktinfilamenten bei Längenkonstanz der Filamente selbst vorbeigleiten. (Huxley 1972)

Kräfte, die in Filamentenrichtung zyklisch und asynchron wirken, sind für die Verschiebung der Filamente gegen äußere und innere Widerstände verantwortlich. Der dazu notwendige Energiebedarf wird durch Dephosphorylierung von ATP (Adenosintriphosphat) gespeist. Die Kontraktion und die ATP-Spaltung sind zwei eng miteinander verknüpfte Vorgänge, die gleichartig vom ionalen Milieu abhängig sind. Die essentiellen "Co-Faktoren" zur Kontraktion bzw. ATP-Spaltung sind Mg^{++} und Ca^{++} . Während Mg^{++} stets in genügender Menge im Myoplasma vorhanden sind, sind die freien Ca^{++} im Myoplasma der erschlafften Muskelfaser unter die für Kontraktion bzw. ATP-Spaltung notwendige Schwellenkonzentration abgesunken. Steigt die $[Ca^{++}]$ an, so werden ATP-Spaltung und Kontraktion "angestellt". Eine maximale Aktivierung wird erreicht bei $[Ca^{++}]_{i.c.} (intrazellulär) \geq 10^{-6}$ Mol/l eine vollständige Erschlaffung bei $[Ca^{++}]_{i.c.} \leq 10^{-7}$ Mol/l. (Hasselbach 1971)

Die Ca^{++} sind somit Aktivatoren der kontraktile Elemente.

Unter physiologischen Bedingungen ist bei allen Muskeltypen immer der Kontraktion ein AP (Aktionspotential) der die Muskelfaser umgebenden Plasmamembran vorgeschaltet. Das AP triggert die Kontraktion über eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{++}]_{i.c.}$. Die Koppelung zwischen elektrischem Signal und mechanischem Effekt wird stets durch die Aktivatorsubstanz Ca vermittelt. Dieses Prinzip scheint allen Vertebratenmuskeln gemeinsam zu sein. Betrachtet man jedoch die Kette von Ereignissen, die die Erhöhung der $[\text{Ca}^{++}]_{i.c.}$ an das AP der Zellmembran ankoppelt, so ergeben sich für Skelett-, Herz- und glatte Muskulatur charakteristische Unterschiede.

Am besten bekannt ist diese Ereigniskette der elektromechanischen Koppelung am Skelettmuskel.

Dem AP der Skelettmuskelmembran liegen qualitativ die gleichen Permeabilitätsveränderungen zugrunde wie der Nervenmembran: einer initialen raschen Permeabilitätssteigerung für Na^+ (Anstiegsphase des AP) folgt ihr rascher Abfall und eine verzögerte Zunahme der Permeabilität für K^+ (Repolarisationsphase des AP). Das AP wird über das T-System (System der transversalen Tubuli) in die Tiefe der Muskelfaser geleitet. Die in das Innere der Faser fortgeleitete Erregung bewirkt eine Freisetzung von Ca^{++} aus intrazellulären Ca-Speichern - den longitudinalen Vesikeln des SR (sarkoplasmatisches Retikulum). Das AP des T-Systems ist der physiologische Reiz für die Freisetzung von Ca^{++} aus den Speichern in den myoplasmati-

schen Raum. Die $[Ca^{++}]_{i.c.}$ steigt dadurch auf einen zur vollen Aktivierung der kontraktile Filamente ausreichenden Wert an.

Die Membran der Vesikel des SR besitzt eine ATP betriebene Ca-Pumpe, welche die Ca^{++} aus dem Myoplasmaraum wieder zurück in die Vesikel pumpt : die $[Ca^{++}]_{i.c.}$ nimmt ab auf $\leq 10^{-7}$ Mol/l. Dadurch wird die ATPase inaktiviert, die Fibrillen erschlaffen.

Wie Untersuchungen über die Spannungs-, Strom- und Zeitabhängigkeit der mechanischen Aktivität unter Voltage-Clamp Bedingungen gezeigt haben (Tritthart 1973), scheinen in der Säugerherzmuskelzelle während der elektro-mechanischen Koppelung zwei "Untersysteme" die Ca^{++} -Bewegungen zu kontrollieren:

1. ein i.c. Speichersystem,
 2. ein transmembranales Austausch- und Versorgungssystem.
- Diese beiden Systeme sollen folgendermaßen zusammenarbeiten:

der auto-regenerative Na-Spike triggert ähnlich dem Skelettmuskel die Freisetzung von Ca^{++} aus dem SR. Die Menge der Ca^{++} determiniert den Betrag der kontraktile Aktivierung. Während des AP strömen außer Na^{+} auch Ca^{++} aus dem ECR (Extrazellulärraum) in den myoplasmatischen Raum ein. Dieses "Versorgungs-Ca" scheint zunächst keinen Beitrag zur Kontraktion zu leisten, sondern wird rasch in den i.c. Speicherorten (SR) absorbiert. Von dort kann es dann beim nächsten AP freigesetzt werden. Änderungen der Ca-Versorgung über das transmembranales Austausch- und Versorgungssystem (z.B. bei Frequenzänderung der AP) haben

daher auch eine Änderung des Ca-Gehaltes der i.c. Speicher und damit des Betrags der kontraktilen Aktivierung zur Folge ("Treppenphänomen").

Die Bemühungen vieler Autoren, Licht in die komplexen Vorgänge der elektro-mechanischen Koppelung der glatten Muskelzelle zu bringen, haben bisher zu widersprüchlichen und schwer zu interpretierenden Resultaten geführt. Prinzipiell werden folgende Möglichkeiten über die Herkunft der Aktivator- Ca^{++} diskutiert:

1. mit dem Aktionsstrom der Erregung strömen Ca^{++} aus dem ECR durch die Membran in den ICR (Intrazellulärraum),
 2. als Folge des AP werden Ca^{++} aus lockeren Bindungen der Plasmamembran freigesetzt und diffundieren in den ICR,
 3. analog der elektro-mechanischen Koppelung des Skelettmuskels triggern AP die Freisetzung von Ca^{++} aus i.c. Speicherorten.
- (Edman et al.1962, Hurwitz et al.1971, Peiper et al. 1971, Collins et al.1972)

Histologische Untersuchungen glatter Muskelzellen machen es unwahrscheinlich, daß die elektro-mechanische Koppelung sich des gleichen hochdifferenzierten Speicherapparates bedient wie Skelettmuskelfasern. Diese Untersuchungen stimmen darin überein, daß das morphologische Substrat der elektro-mechanischen Koppelung für die Skelettmuskulatur, die transversalen Tubuli und das SR, in glatten Muskelzellen äußerst spärlich entwickelt sind (Burnstock 1970, Axelsson 1970). Zelck et al. konnten 1972

in elektronenmikroskopischen Untersuchungen Calciumoxalatniederschläge in folgenden Zellstrukturen feststellen:

1. in den Vesikeln des Zytoplasmas, die häufig in engem Kontakt mit Mitochondrien gefunden wurden,
2. in Mitochondrien zwischen innerer und äußerer Membran,
3. in Vesikeln, die nahe der Zellmembran lagen,
4. an der gesamten Zellmembran,
5. zwischen innerer und äußerer Zellkernmembran.

Ca-Kompartiment-Analysen mit radioaktiven Ca^{++} haben charakteristische Unterschiede in den 3 Muskeltypen erbracht. Im Skelettmuskel sind nur ca. 20% des zellulären Ca-Gehaltes austauschbar, im Herzmuskel 50-70%. Dagegen ist unter gleichen Bedingungen das gesamte zelluläre Ca des glatten Muskels ziemlich rasch mit extrazellulärem Ca austauschbar (Lüllmann 1970). Man kann annehmen, daß das Ca, das im SR gebunden ist, nicht mit dem extrazellulären Ca austauschbar ist, solange sich der Muskel in Ruhe befindet.

Das ungünstige Oberflächen-Volumenverhältnis (Quotient 1:15) erfordert für die Herz- und Skelettmuskelfaser einen Ca-Freisetzungsmechanismus aus i.c. Speichern. Im Gegensatz dazu ist es durchaus denkbar, daß die viel kleiner dimensionierten glatten Muskelzellen (Oberflächen-Volumenquotient 1:1) durch einfaches Eindringen von Ca^{++} aus dem ECR oder AP-bedingtes Freisetzen von locker an Membranstellen gebundenem Ca aktiviert werden.

In den letzten Jahren hat die Hypothese immer mehr an Bedeutung gewonnen, daß die den Einwärtsstrom tragenden I_o =

nen während der Membranerregung an der glatten Muskelfaser nicht Na^+ sondern Ca^{++} sind (Brading et al.1969). Eine Erniedrigung der Na^+ _{e.c.} (extrazellulär) auf 0 bewirkte keine Unterdrückung oder Veränderung der AP bei elektrischer Reizung, wohingegen die AP äußerst empfindlich auf Änderungen der $[\text{Ca}^{++}]$ _{e.c.} reagierten. Tetrodotoxin, welches spezifisch den Na^+ -Einstrom hemmt, hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die AP (Tomita 1970).

Wenn man unterstellt, daß sämtliche den einwärtsgerichteten Aktionsstrom tragenden Ionen Ca^{++} sind, läßt sich aus der Membrandepolarisation während eines AP und der Membrankapazität errechnen, daß die während des AP durch die gesamte Membranoberfläche von 1 mg Muskel einwärts transportierte Ca-Menge sich auf 4×10^{-12} Mol beläuft. Wegen des großen Oberflächen-Volumenquotienten würde diese Menge ausreichen, um die $[\text{Ca}^{++}]$ _{i.c.} auf 7×10^{-6} Mol/l zu erhöhen, was zur vollen Aktivierung der kontraktilen Elemente ausreicht (Casteels 1970). Dabei wird angenommen, daß ein Aktivierungsverhältnis von 1:1 (Ca^{++} : Myosinmoleküle) vorliegt (Hasselbach 1971).

Gegen diese Beobachtungen sprechen allerdings die Untersuchungsergebnisse von Mayer et al.(1972), die Fluxmessungen mit verfeinerter Technik durchgeführt haben. Sie konnten zeigen, daß selbst in spontan aktiven Präparaten von Taenien die Ca-Permeabilität so gering ist, daß nur ein kleiner Teil der den Einwärtsstrom tragenden Ionen während des AP Ca^{++} sein können. Diese eindringenden Ca^{++} könnten als Trigger fungieren, indem sie die intrazellulär lokalisierten Ca^{++} mobilisieren.

Weitere Anhaltspunkte zur Herkunft der zur Kontraktion aktivierten Ca^{++} können gewonnen werden, wenn der Zeitverlauf der Kontraktionen untersucht wird, die durch "Kontraktionsstoffe" wie K^+ , ACh (Acetylcholin) und Histamin hervorgerufen werden.

Man unterscheidet bei einer chemisch induzierten Kontraktion von Taenienbündeln eine phasische und eine tonische Kontraktionsphase. Sie werden auf unterschiedliche Kompartimentierung der Ca^{++} , die diese Phasen auslösen, bezogen. Das Kontraktionsmaximum wird während der phasischen Kontraktion erreicht. Es wird nach Niedergerke (1963), van Breemen et al.(1966) und Hurwitz et al.(1970) durch Freisetzung intrazellulär gebundener Ca^{++} angekurbelt nach Urakawa et al.(1964) durch freigesetzte Ca^{++} verursacht. Imai et al.(1967) dagegen glauben, daß das Kontraktionsmaximum stärker von der $[\text{Ca}^{++}]_{\text{e.c.}}$ abhängig ist, da bei einer Senkung der $[\text{Ca}^{++}]_{\text{e.c.}}$ das Kontraktionsmaximum stärker beeinflußt wurde als die nachfolgende tonische Kontraktur.

Der sich an das Kontraktionsmaximum anschließende plateauartige Anteil der Kontraktion wird einmütig als Funktion der $[\text{Ca}^{++}]_{\text{e.c.}}$ angesehen (Biamino et al.1970, Collins et al.1972, Godfraind et al.1972). Lediglich Imai et al.(1967) differenzieren noch in einen 1. und 2. Teil. Dabei soll der 1. Teil durch den Einstrom von $\text{Ca}^{++}_{\text{e.c.}}$, der 2. Teil durch die Freisetzung intrazellulär gebundener Ca^{++} bedingt sein.

Man darf annehmen, daß Einstrom von Ca^{++} aus dem ECR und Freisetzung intrazellulär gespeicherter Ca^{++} zusammen die

$[Ca^{++}]_{i.c.}$ bis zu einem Wert erhöhen können, der die kontraktile Elemente voll aktiviert. Die relative Bedeutung des Einstroms von $Ca^{++}_{e.c.}$ einerseits und der Mobilisierung von i.c. gebundenen Ca^{++} andererseits für die Aktivierung der kontraktile Filamente unter physiologischen Bedingungen ist bisher nicht bekannt.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Kontraktion der glatten Muskelzellen an die Erregung ihrer Plasmamembran angekoppelt. Die Generierung von AP ist jedoch nicht die einzige Möglichkeit, eine glatte Muskelfaser zur Kontraktion zu bringen. Es lassen sich grundsätzlich drei Wege zur Aktivierung des kontraktile Systems unterscheiden:

1. Aktivierung durch AP,
2. Aktivierung durch Dauerdepolarisation,
3. Aktivierung durch direkte pharmakologische Wirkungen ohne Veränderungen an der Zellmembran
(pharmako-mechanische Koppelung).

Bozler schloß aus seinen Beobachtungen von 1948, daß unter physiologischen Bedingungen der Tonus glatter Muskelzellen durch dauernde AP-Entladungen aufrechterhalten würde.

Bülbring konnte 1955 mit Hilfe intrazellulärer elektrischer Ableittechnik diese Beobachtungen für die *Taenia coli* bestätigen. Darüberhinaus fand sie eine direkte Proportionalität zwischen Kontraktionskraft und AP-Frequenz, die ihrerseits in umgekehrtem Verhältnis zum Membranpotential standen. Diese Proportionalität besteht aber nur bis zu einer bestimmten Grenze der Membrandepolarisation,

die nach Riemer (unveröffentlicht) bei ca. -30 mV liegt und als Depolarisationsblock bezeichnet wird, weil bei weiterer Depolarisation keine AP mehr abgefeuert werden können. Unter den Bedingungen des Depolarisationsblockes ist das kontraktile System dauernd zur sogenannten Depolarisationskontraktur aktiviert.

Zahlreiche Beobachtungen haben gezeigt, daß verschiedene Pharmaka fördernde oder hemmende Wirkungen auf die Aktivierung des kontraktilen Systems haben, ohne daß dabei das Membranpotential irgendwie verändert wird. Evans et al. (1957, 1958) fanden, daß die bei vollständig depolarisierter Membran bestehende Kontraktionskraft noch durch Zugabe von ACh, Histamin, 5-Hydroxytryptamin und Oxytocin erhöht werden kann.

Es gibt wenig Zweifel daran, daß die Aktivierung immer durch Erhöhung der $[Ca^{++}]_{i.c.}$ bewirkt wird. Die verschiedenen Möglichkeiten zur Aktivierung können darin begründet sein, daß verschiedene Ca-Kompartimente veranlaßt werden, ihre Ca^{++} zur Aktivierung des Kontraktionsapparates abzugeben.

Man muß vernünftigerweise annehmen, daß diese verschiedenen Ca-Kompartimente mit dem extrazellulären Ca-Pool kommunizieren. Infolgedessen müssen sie auch entsprechend ihrer weniger oder mehr direkten Verbindung zu diesem Pool von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ abhängen. Diese Abhängigkeit müßte quantifizierbar werden, wenn die Kontraktionseffekte der verschiedenen "Kontraktionsstoffe" in ihrer Abhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ erfaßt werden. Gleiches gilt für

die durch "physiologische" AP-Salven hervorgerufenen Kontraktionen.

Unter der Voraussetzung, daß AP und die verschiedenen "Kontraktionsstoffe" verschiedene Ca-Kompartimente aktivieren, sollten sich auch die Wirkungen der Ca-Antagonisten unterscheiden, weil auch diese an verschiedenen Ca-Kompartimenten angreifen könnten. Entsprechend sollte die Hemmbarkeit solcher Kompartiment-Aktivatoren größer sein, bei denen ECR-nahe Kompartimente betroffen sind, denn diese sind für den Antagonisten am besten zugänglich.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der quantitativen Abhängigkeit der durch Aktivierung verschiedener hypothetischer Ca-Kompartimente induzierten Kontraktionen von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ und deren Hemmbarkeit durch Ca-Antagonisten.

Die Abhängigkeit der durch AP aktivierten Ca-Kompartimente von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ wurde bestimmt durch Erfassen der spontanen rhythmischen Kontraktionen der Taenia coli in Ca^{++} -Lösungen mit verschiedenen $[Ca^{++}]$. Diese Messungen wurden durch Versuche ergänzt, bei denen durch konstante und reproduzierbare Depolarisationen Kontraktionen induziert wurden.

Verbringt man eine Taenia coli aus normaler Locke-Lösung in K_2SO_4 -Locke-Lösung, in der das NaCl (154 mMol/l) durch K_2SO_4 (126 mMol/l) ersetzt ist, kontrahiert der Muskel in zwei aufeinander folgenden deutlich unterscheidbaren Phasen: von einem schnell erreichten hohen Gipfel

(phasischer Teil der Kontraktion) fällt die Spannung auf ein Plateau ab, das lange Zeit eine fast konstante Spannung hält (tonischer Teil der Kontraktion). Simultane Messungen von elektrischer und mechanischer Aktivität bei Zugabe von K_2SO_4 -Locke haben ergeben, daß das transmembranale Potential rasch vom Ruhepotential (ca. - 50 mV) auf 0 mV abfällt. Diese Depolarisation zeigt zwei Phasen: solange das absinkende Membranpotential noch größer als ca. - 30 mV ist, werden in hoher Frequenz AP abgefeuert. Bei ca. - 30 mV nehmen die AP die Form sinusförmiger Oszillationen an, deren Amplituden immer kleiner werden bis sie bei ca. - 25 mV ganz versiegen (Riemer : unveröffentlicht). Die Membran befindet sich dann im Depolarisationsblock. Die Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß der phasische Teil durch die hochfrequenten AP verursacht werden könnte, der tonische Teil dagegen durch Membraneigenschaften, die der Depolarisationsblock bewirkt.

Die beiden Kontraktionsphasen scheinen durch Aktivierung verschiedener Ca-Kompartimente bewirkt zu werden. Die Behandlung des Präparates mit K_2SO_4 -Locke-Lösung ist also ein einfaches und gut reproduzierbares Mittel, die Abhängigkeit der hypothetischen Ca-Kompartimente von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ und deren Hemmbarkeit durch Ca-Antagonisten zu studieren und miteinander zu vergleichen.

Ferner kann durch Gabe von ACh und Histamin zu bereits durch K_2SO_4 -Locke depolarisierten Präparaten die Wirkung auf weitere Ca-Kompartimente beobachtet werden, die zum

pharmako-mechanischen Koppelungsmechanismus gehören. Denn durch Zugabe dieser Stoffe wird der elektrische Zustand der auf 0 mV depolarisierten Zellmembran nicht mehr verändert.

Als Ca-Antagonisten wählten wir in unseren Versuchen das erstmalig 1962 von Haas und Haertfelder beschriebene Ip (Iproveratril) (α -Isopropyl- α -[(N-methyl-N-homoveratryl)- γ -aminopropyl]-3,4-dimethoxyphenyl-acetonitril hydrochlorid). Fleckenstein (1968) sah das Wirkprinzip der Ca-Antagonisten am Herzmuskel in einer elektro-mechanischen Entkoppelung, denn während Ip Membranpotential, AP-Frequenz und den Zeitverlauf der AP praktisch nicht beeinflusste, wurden die angekoppelten Herzkontraktionen dosisabhängig in ihrer Amplitude reduziert. Golenhofen et al.(1972) wiesen darauf hin, daß Ip an der *Taenia coli* auch die elektrischen Parameter beeinflusst, insbesondere die Frequenz der AP. Riemer et al.(1972) konnten diesen Befund bestätigen.

Methodik

Die Taenia coli des Meerschweinchens war Versuchsobjekt bei unseren sämtlichen Untersuchungen an der glatten Muskulatur.

Gewinnung des Taenienpräparates:

Das Meerschweinchen wurde durch Genickschlag getötet. Sofort anschließend wurde nach Eröffnen des Abdomens die Caecumschlinge freigelegt und die Taenie abpräpariert. Um ein Austrocknen der Taenie zu verhindern, wurde sie schon während der Präparation kontinuierlich mit Normal- lösung feucht gehalten. Danach wurde die Taenie an beiden Enden angeschlungen und vertikal in das Versuchsgesäß gehängt. Das untere Ende der Taenie wurde am Gefäß fixiert, während die Fadenschlinge am oberen Ende der Taenie mit der Registrierapparatur in Verbindung stand.

Isometrische Meßapparatur:

Durch Entfernen eines kleinen Aluminiumplättchens vor dem Kopf einer mit hochfrequentem Wechselstrom gespeisten Spule wurde die Resonanzfrequenz des Schwingkreises verändert. Diese Veränderungen wurden über einen Wegmesser (HSE) verstärkt und auf einen Direktschreiber übertragen.

Bei einigen Versuchen verwendeten wir einen Dehnungs- meßstreifen (DMS). Sein Prinzip beruht auf der gegensätzlichen Veränderung des elektrischen Widerstandes des DMS auf der Ober- und Unterseite eines Biegestabes. Über eine Brückenschaltung werden Spannungsänderungen bei Widerstandsänderungen summiert und schließlich auch auf den Direktschreiber übertragen.

Badegefäß:

Das Badegefäß bestand aus einem 2-wandigen Glasbehälter, in dessen innerem Teil die Taenie aufgehängt war. Das Volumen des Badegefäßes betrug 5,9 ml. Durch den äußeren Mantel floß Wasser, das für Temperaturkonstanz sorgte.

Sämtliche Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, bei $35 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, da nach Evans et al. (1958) bei 35°C maximale Kontraktionen auftreten. Die Temperatur wurde laufend dicht an der Taenienoberfläche mittels eines Thermoelementes kontrolliert.

Lösungen:

Für konstanten Lösungsdurchfluß sorgte eine Membranpumpe. Die Durchlaufgeschwindigkeit wurde so eingestellt, daß jeweils alle 30 Sek. das Volumen des Badegefäßes einmal erneuert war. Abweichende Durchlaufgeschwindigkeiten sind im Ergebnisteil angegeben.

Wir verwendeten folgende Lösungen:

Krebs-Lösung (Krebs-Henseleit):

120,4 mMol/l NaCl	5,9 mMol/l KCl
15,4 mMol/l NaHCO_3	1,2 mMol/l MgCl_2
1,2 mMol/l NaH_2PO_4	2,3 mMol/l CaCl_2
11,5 mMol/l Glucose	

Locke-Lösung (Brading 1970):

154 mMol/l NaCl	5,6 mMol/l KCl
2,2 mMol/l CaCl_2	1,8 mMol/l NaHCO_3
5,6 mMol/l Glucose	

K_2SO_4 -Locke-Lösung:

NaCl (154 mMol/l) wurde durch K_2SO_4 (126 mMol/l) ersetzt.

Die verwendeten Lösungen wurden mit Carbogen (Gasgemisch von 95% O_2 und 5% CO_2) durchströmt.

Die Locke-Lösungen wurden mit 1 n NaOH (2,4 ml/l) bzw. 1 n KOH (1,8 ml/l) auf einen physiologischen pH-Wert eingestellt. Messungen des pH-Wertes ergaben einen pH, der im Bereich von 7,1-7,25 je nach Durchströmungsgeschwindigkeit mit Carbogen lag.

Bei allen Versuchen wurden frische Lösungen verwendet. Der Badwechsel wurde durch Änderung der Zusammensetzung der kontinuierlich dem Badegefäß zufließenden Lösung bewerkstelligt.

Alle im Ergebnisteil als Ca-frei bezeichneten Lösungen enthielten auf Grund der Verunreinigung der verschiedenen Salze mit Ca einen geringen Anteil an Ca^{++} , der bei der Locke-Lösung $4,5 \times 10^{-6}$ Mol/l und bei der K_2SO_4 -Locke-Lösung $2,7 \times 10^{-5}$ Mol/l betrug. Somit erhöhen sich auch alle im Ergebnisteil angeführten $[Ca^{++}]$ um die angegebenen Beträge.

Jedes Präparat wurde mit 250 mp vorgedehnt. Diese Vordehnung wurde im völlig relaxierten Zustand vorgenommen. Dies wurde durch Gabe von Adrenalin (1×10^{-6} Mol/l) in Normallösung erreicht. Bei den Versuchen ergaben sich L_0 (Erschlaffungslängen), die im Bereich von 3,5-5,3 cm lagen.

Die Konzentrationen der verwendeten Pharmaka werden bei der Erläuterung der Ergebnisse angegeben.

Ergebnisse

1. Spontanverhalten in Normallösung

Erst ca. 20 Min. nach Einbringen des Taenienpräparates in eine Krebs-Lösung setzt die spontane mechanische Aktivität ein. Dabei lassen sich zwei Aktivitätsmuster, die 1970 von Loh et al. bei ihren Versuchen feststellten, unterscheiden:

1. periodische Aktivität rhythmischer Kontraktionen und Erschlaffungen,
2. Dauerkontraktion mit annähernd konstanter isometrischer Spannung, deren Betrag von Präparat zu Präparat sehr wechselt.

Die Frequenz der periodischen Aktivität liegt im Bereich von 0,5-0,25/Min.. Zwischen je 2 spontanen Kontraktionen erschläfft das Präparat nur bis auf eine Restspannung von 5-15% der durchschnittlichen spontanen Gipfelspannung. Die Kontraktionsgeschwindigkeit ($+dP/dt$) ist größer als die Erschlaffungsgeschwindigkeit ($-dP/dt$). Die spontanen isometrischen Maximalkontraktionen betragen ungefähr 80-85% der durch ACh (10^{-5} Mol/l) erzielten Spannung. Allerdings werden auch Präparate gefunden, deren spontane Kontraktionen genauso hoch sind wie die ACh-Kontraktionen.

2. Spontanverhalten bei verschiedenen $[Ca^{++}]_{e.c.}$

Die Abhängigkeit der spontanen Aktivität von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ in der Badeflüssigkeit wird in 4 Versuchen geprüft. Bei der sehr geringen Vorspannung von 0,25p äquilibriert der

Muskel über 20 Min.. Dann beginnen gleichmäßige spontane rhythmische Kontraktionen. Nach Ca-Entzug verschwinden sie. Der Muskel erschlafft gänzlich. In diesem Zustand wird Ca in 2 $[Ca^{++}]$ -Reihen schrittweise dem Versuchsbad zugesetzt:

1.)	$2,2 \times 10^{-4}$ Mol/l	2.)	$1,8 \times 10^{-5}$ Mol/l
	$3,4 \times 10^{-4}$ Mol/l		1×10^{-4} Mol/l
	$5,5 \times 10^{-4}$ Mol/l		$1,8 \times 10^{-4}$ Mol/l
	$7,6 \times 10^{-4}$ Mol/l		3×10^{-4} Mol/l
	$1,2 \times 10^{-3}$ Mol/l		$5,5 \times 10^{-4}$ Mol/l
	$1,7 \times 10^{-3}$ Mol/l		1×10^{-3} Mol/l
	$2,5 \times 10^{-3}$ Mol/l		$1,8 \times 10^{-3}$ Mol/l
	$3,7 \times 10^{-3}$ Mol/l		3×10^{-3} Mol/l
	$5,5 \times 10^{-3}$ Mol/l		$5,5 \times 10^{-3}$ Mol/l

Bei jedem $[Ca^{++}]$ -Schritt werden 20-24 Min. zur Äquilibration abgewartet, ehe die Kontraktionen gemessen werden. Nach Applikation der höchsten $[Ca^{++}]$ wird der Muskel vom überschüssigen Ca durch 45-minütiges Waschen in Krebs-Lösung mit normaler $[Ca^{++}]$ befreit. Es zeigt sich danach, daß die Kontraktionen wieder zu ihren Ausgangswerten zurückkehren. Der Effekt der erhöhten $[Ca^{++}]$ ist also voll reversibel.

Im allgemeinen wachsen die spontanen rhythmischen Kontraktionsamplituden mit der $[Ca^{++}]$. Dennoch findet sich von Präparat zu Präparat eine große Variabilität in der quantitativen Abhängigkeit seines spontanen Aktivitätsmusters von der $[Ca^{++}]$. So schwankt die Ca-Schwellenkonzentration, von der ab spontane Kontraktionen auftreten, zwischen 10^{-4} und $3,5 \times 10^{-4}$ Mol/l. Das absolute Kontraktionsmaximum wird bei $[Ca^{++}]_{e.c.}$ von $1,5$ bis $3,7 \times 10^{-3}$ Mol/l erreicht. Die $[Ca^{++}]_{e.c.}$, bei der halbmaximale

Spontankontraktionen erreicht werden, variiert zwischen 2 und $7,5 \times 10^{-4}$ Mol/l. In bemerkenswertem Gegensatz zu dieser Variabilität der Ca-Abhängigkeit der Kontraktionshöhe ist bei den rhythmisch tätigen Präparaten die Periodendauer unabhängig von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$.

Einen typischen Verlauf zeigt die Originalregistrierung in Abb.1.

Einem steilen Anstieg der Kontraktionsamplituden mit steigender $[Ca^{++}]$ bis zu einem Maximum folgt bei weiterer Erhöhung der $[Ca^{++}]$ eine Spannungsabnahme. Die Schwellenkonzentration für die spontanen rhythmischen isometrischen Kontraktionen liegt bei diesem Versuch bei $3,4 \times 10^{-4}$ Mol/l Ca, die ED_{50} (effektive Dosis₅₀) bei $7,6 \times 10^{-4}$ Mol/l und das Kontraktionsmaximum bei $3,7 \times 10^{-3}$ Mol/l Ca.

In Abb.2 ist ein repräsentativer Versuch dargestellt. Die Ordinate zeigt die arithmetischen Mittelwerte der spontanen Kontraktionen, die bei den $[Ca^{++}]_{e.c.}$ erzielt werden, die auf der Abszisse dargestellt sind. Alle Spannungen sind auf den Mittelwert der Maximalspannungen bezogen (bei $1,8 \times 10^{-3}$ Mol/l Ca). Als Schwellenkonzentration sind hier 10^{-4} , als ED_{50} 4×10^{-4} Mol/l Ca erkennbar. $5,5 \times 10^{-3}$ Mol/l Ca ist bereits eine "überoptimale" $[Ca^{++}]$, die Spannung sinkt wieder auf 86% des Maximalwertes ab.

Abb.2: Maximale spontane Kontraktionen in Abhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ (1 Versuch)

Ordinate: relative Kontraktionsmaxima bezogen auf die maximale Kontraktion bei optimaler $[Ca^{++}]$

Abszisse: $[Ca^{++}]_{e.c.}$

Die $[Ca^{++}]$ wurden jeweils nach 20 Min. kumulativ erhöht. Es wurde bei jeder $[Ca^{++}]$ die höchste Spontankontraktion ausgewertet.

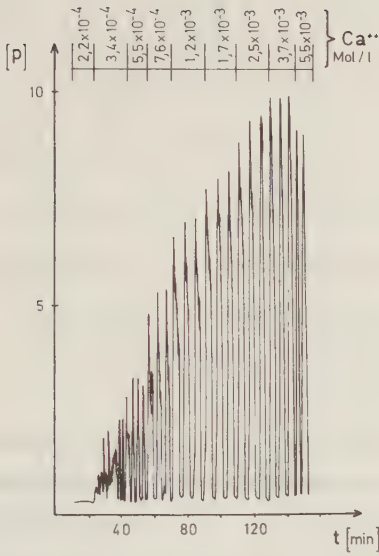


Abb.1: Wirkung ansteigender $[\text{Ca}^{++}]$ auf spontane minutenrhythmische Kontraktionen
Krebs-Lösung bei 35°C

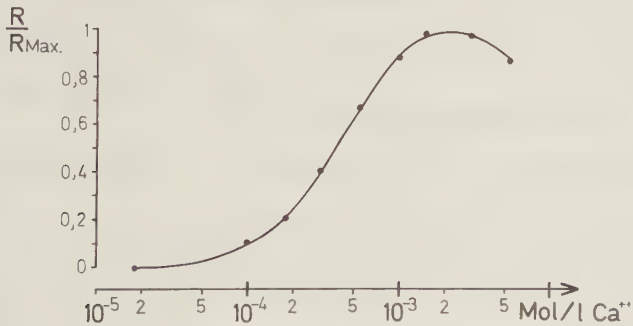


Abb.2

3. Zeitverlauf der Iproveratril-Hemmung

Die Hemmwirkung des Iproveratrils erreicht ihr Maximum erst nach einer Zeit, die zur Diffusion an seinen Wirkort erforderlich ist. Es ist daher notwendig, die Zeitspanne zu kennen, die verstreichen muß, ehe die maximale Hemmwirkung einer gegebenen [Ip] auftritt. Hierzu werden die Taenienpräparate im Verlauf des Anflutens der Ip-Hemmung mehrfach einer Kalium-Kontraktur unterworfen (Ersatz des NaCl einer Locke-Lösung durch K_2SO_4). Dadurch wird im Gegensatz zu spontanen Kontraktionen eine reproduzierbare Kontraktionskraft erhalten.

Abb.3 zeigt einen solchen Versuch. Es werden 60 Min. nach Eintauchen des Taenienpräparates in eine normale Locke-Lösung während weiterer 60 Min. 12 Kalium-Kontrakturen von je 1 Min. in 4-minütigen Abständen ausgelöst. Ihr Mittelwert ist der Bezugswert für die Iproveratril-gehemmten Kontraktionen.

In gleichbleibenden Abständen werden in Gegenwart von 3×10^{-7} Mol/l Ip die stufenweise abnehmenden Kalium-Kontrakturen registriert. Nach 90 Min. wird Ip ausgewaschen, und die Kontraktionskraft nimmt wieder zu. Nach etwa 80 Min. ist die Hemmung ganz beseitigt.

Die Halbwertszeit für die Hemmung durch 3×10^{-7} Mol/l Ip beträgt 20 Min. für die Reaktivierung 40 Min.. Bei 10^{-6} Mol/l Ip ist bereits nach 8 Min. die Hälfte der dieser [Ip] entsprechenden Hemmwirkung erreicht. Nach 35 Min. (3×10^{-7} Mol/l Ip) bzw. 20 Min (10^{-6} Mol/l Ip) ist die volle Hemmung eingetreten. Sie liegt bei 20% der un-

gehemmten Kontraktionskraft.

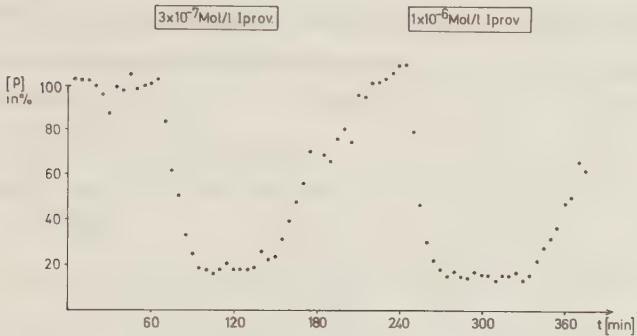


Abb.3: Zeitverlauf der Iproveratril-Hemmung der Kalium-Kontraktur eines Taenienpräparates. Dauer der Hemmer-Einwirkung ist durch die beiden beschrifteten Balken dargestellt. Jeder Punkt gibt die Kontraktionsantwort durch Zugabe einer Kalium-Locke-Lösung an, in der NaCl durch K_2SO_4 ersetzt wurde. (Isotonie $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{--}$)

4. Einfluß von Iproveratril auf die Spontanaktivität

Zur Erfassung des Ip-Effektes auf die spontan-rhythmischen Kontraktionen werden aufsteigende $[\text{Ip}]$ in 3 Schritten kumulativ zugesetzt:

1×10^{-7} , 3×10^{-7} und $1 \times 10^{-6} \text{ Mol/l}$.

Die Originalregistrierung der Abb.4 wird jeweils 30 Min. nach Änderung der $[\text{Ip}]$ gewonnen, denn erst 30 Min. nach Gabe bzw. Erhöhung der $[\text{Ip}]$ bleiben die Kontraktionsamplituden gleich.

Es zeigt sich, daß Ip in einer Konzentration von $3 \times 10^{-7} \text{ Mol/l}$ die Periodik der rhythmischen Kontraktionen nicht

beeinflusst nur deren Amplituden. Bei einer $[Ip]$ von 10^{-6} Mol/l wird die Spannungsentwicklung nicht mehr rhythmisch moduliert sondern verharrt gleichbleibend auf einem niedrigen Niveau. Solange Rhythmik besteht, hat Ip keinen Einfluß auf die Frequenz der spontanen Kontraktionen.

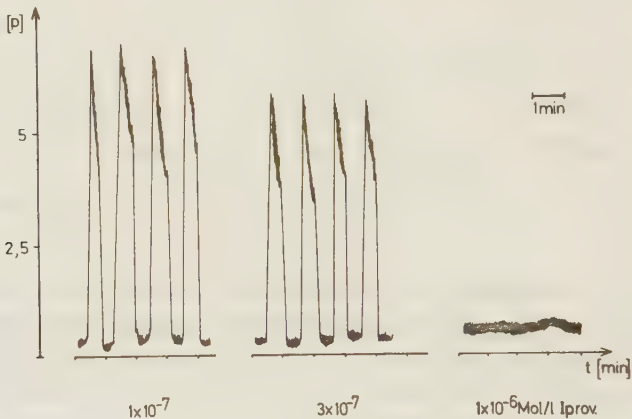


Abb.4: Wirkung verschiedener $[Ip]$ auf spontane minutenrhythmische Kontraktionen nach einer Inkubation von jeweils 30 Min. der kumulativ erhöhten $[Ip]$ Krebs-Lösung bei $35^{\circ}C$

5. Spontanverhalten bei verschiedenen extrazellulären $[Ca^{++}]$ und konstanter $[Iproveratril]$

Aus den bisherigen Versuchen geht hervor, daß das Kontraktionsmaximum abhängig ist

1. von der $[Ca^{++}]$ e.o.
2. von der $[Ip]$.

Zur Aufklärung des Wirkprinzipes der Ip-Hemmung werden die $[Ca^{++}]$ -Effekte auf die Kontraktionsmaxima der

spontanen Mechanik in Gegenwart von 3×10^{-7} Mol/l und ohne Ip beobachtet.

Die Originalregistrierung in Abb.5 zeigt einen solchen Versuch. Die Originalkurven zeigen in Abwesenheit von Ip das bereits bekannte Verhalten:

- Ansteigen der Kontraktionsamplituden mit steigender $[Ca^{++}]$ bis zu einem Maximum,
- Abnahme der Kontraktionsamplituden bei "überoptimaler" $[Ca^{++}]$.

In Gegenwart von Ip finden wir ebenfalls einen Anstieg der allerdings geminderten Kontraktionsamplituden. Dagegen bewirkt dieselbe $[Ca^{++}]$, die ohne Ip eine Abnahme der Spannung verursacht, hier eine weitere Zunahme der Kontraktionsamplitude.

In der Abb.6 ist dazu ein weiterer Versuch dargestellt. Nach 60-minütiger Inkubation in Ca-freier Krebs-Lösung wird die $[Ca^{++}]$ schrittweise erhöht. Jeder der 8 Konzentrationsschritte dauert 15 Min.:

4 $\times 10^{-5}$ Mol/l	7 $\times 10^{-4}$ Mol/l
1,2 $\times 10^{-4}$ Mol/l	1,5 $\times 10^{-3}$ Mol/l
2 $\times 10^{-4}$ Mol/l	4 $\times 10^{-3}$ Mol/l
3,2 $\times 10^{-4}$ Mol/l	1 $\times 10^{-2}$ Mol/l

Nach Durchlaufen dieser Konzentrationsreihe wird das Taenienpräparat 60 Min. lang in Ca-freier Krebs-Lösung mit Iproveratril (3×10^{-7} Mol/l) inkubiert. Es folgt dann erneut die oben beschriebene schrittweise Erhöhung der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ bei konstanter $[Ip]$ (3×10^{-7} Mol/l).

Abb.6 zeigt die isometrischen Kontraktionsmaxima bei den angegebenen $[Ca^{++}]_{e.c.}$ bezogen auf das Kontraktionsma-

ximum, das in Abwesenheit von Iproveratril bei optimaler $[Ca^{++}]$ erzielt wird. Diese optimale $[Ca^{++}]_{e.c.}$ beträgt $1,5 \times 10^{-3}$ Mol/l. Die Abbildung zeigt bei halblogarithmischer Auftragung den S-förmigen Kurvenverlauf wie bei einer Dosis-Wirkungsbeziehung. Die Dosis-Wirkungskurve in Gegenwart von Ip ist annähernd parallel nach rechts zu höheren $[Ca^{++}]$ verschoben. Ihr Maximum liegt zwar nur bei ca. 75% der Dosis-Wirkungskurve ohne Ip, die Kurven konvergieren jedoch bei der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ von 10^{-2} Mol/l. Die hemmende Wirkung des Iproveratrils scheint also bei hohen $[Ca^{++}]$ geringer zu werden oder sogar ganz aufzuheben. Das ohne Iproveratrilhemmung bei 10^{-2} Mol/l Ca erzielte Kontraktionsmaximum ist nur halb so groß wie das bei optimaler $[Ca^{++}]_{e.c.}$ von $1,5 \times 10^{-3}$ Mol/l.

Abb.6: Spontane Kontraktionen eines Präparates in Abhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ ohne (●) und mit (x) 3×10^{-7} Mol/l Ip

Ordinate: Kontraktionen bezogen auf die bei der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ von $1,5 \times 10^{-3}$ Mol/l aufgetretenen Kontraktionen (R_{Max})

Abszisse: $[Ca^{++}]_{e.c.}$

Die Vorinkubationszeiten betragen für alle $[Ca^{++}]$ 15 Min. und für das Ip 60 Min..

Zeitliches Vorgehen siehe Text

Krebs-Lösung bei $35^{\circ}C$

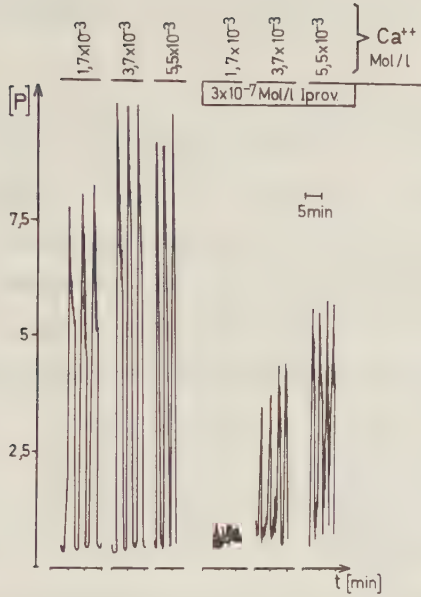


Abb.5: Einfluß ansteigender $[\text{Ca}^{++}]$ auf die spontanen minutenrhythmischen Kontraktionen ohne Ip (linke Bild= hälfte) und bei 3×10^{-7} Mol/l Ip (rechte Bildhälfte) Krebs-Lösung bei 35°C

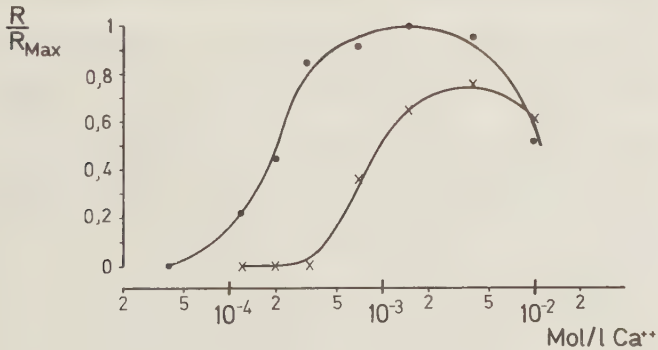


Abb.6

6. Ca^{++} - und Iproveratrilwirkung auf die phasische Kontraktion

Es wird die Höhe der isometrischen Kalium-Kontrakturen in Abhängigkeit von der $[\text{Ca}^{++}]_{\text{e.c.}}$ bei 6 Präparaten ohne und bei 4 Präparaten in Gegenwart von 3×10^{-7} Mol/l Ip bestimmt. Dazu wird den Präparaten zunächst durch 40-minütiges Inkubieren in Ca-freier Locke-Lösung das austauschbare Ca entzogen. Dabei kommt es zu maximaler Erschlaffung. Dann werden aufsteigende $[\text{Ca}^{++}]$ der Lösung

zugegeben:	$2,2 \times 10^{-5}$ Mol/l	$2,2 \times 10^{-3}$ Mol/l
	1×10^{-4} Mol/l	5×10^{-3} Mol/l
	$2,2 \times 10^{-4}$ Mol/l	1×10^{-2} Mol/l
	5×10^{-4} Mol/l	$2,2 \times 10^{-2}$ Mol/l
	1×10^{-3} Mol/l	

Bei jeder $[\text{Ca}^{++}]$ werden 15 Min. zur Äquilibration abgewartet und dann durch K_2SO_4 -Locke-Lösung die 1 Min. dauernde Kalium-Kontraktur ausgelöst. Nach dem 9. Kontraktionsschritt bei $2,2 \times 10^{-2}$ Mol/l Ca wird der gleiche Versuchsablauf in Gegenwart von 3×10^{-7} Mol/l Ip wiederholt. Der Badwechsel dauert 17 Sek. (siehe Methodik).

Die Versuche sind so ausgewertet, daß sämtliche Kontraktionen, die bei den verschiedenen $[\text{Ca}^{++}]_{\text{e.c.}}$ während eines Versuchs aufgetreten sind, in % der maximal erreichten Spannung ausgedrückt sind. Das Maximum findet sich 3x bei der $[\text{Ca}^{++}]_{\text{e.c.}}$ von 10^{-2} , 2x bei 5×10^{-3} und 1x bei $2,2 \times 10^{-2}$ Mol/l.

Die Tabelle I gibt die an jedem Versuchstag bei jeder $[\text{Ca}^{++}]$ erzielte Kontraktion sowie Mittelwerte und Standardabweichungen an.

Die Abb.7 zeigt in halblogarithmischer Darstellung die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen den $[Ca^{++}]_{e.c.}$ (Abszisse) und den Kalium-Kontrakturen (Ordinate) ohne (●) und in Gegenwart von 3×10^{-7} Mol/l Ip (x). Zur besseren Übersicht sind die Standardabweichungen nur in einer Richtung eingezeichnet.

Die Kurve ohne Ip erreicht 100% nicht. Das hat seinen Grund darin, daß die maximalen Kontraktionen der Präparate nicht bei derselben $[Ca^{++}]_{e.c.}$ auftreten.

Aus der Abb.7 ergeben sich für die mittleren Schwellenkonzentrationen $[Ca^{++}]_{e.c.}$ von $2,2 \times 10^{-5}$ (ohne Ip) und $2,2 \times 10^{-4}$ Mol/l (mit Ip), die mittleren ED_{50} von $3,4 \times 10^{-4}$ bzw. 2×10^{-3} Mol/l. Die Maximalkontraktionen ohne und in Gegenwart von Ip treten bei 10^{-2} Mol/l Ca auf.

Auch hier zeigt sich wie bei den spontanen Kontraktionen mit steigender $[Ca^{++}]$ ein Anstieg der Kontraktionsamplituden bis zu einem Maximum. Bei weiterer Erhöhung der $[Ca^{++}]$ nimmt die Kontraktionsspannung wieder ab, allerdings nicht in dem Ausmaß wie bei den spontanen Kontraktionen. Während bei 10^{-2} Mol/l Ca die spontanen Kontraktionen schon auf die Hälfte reduziert sind, ist die K^{+} -Kontraktur noch maximal. Diese nimmt erst bei $2,2 \times 10^{-2}$ Mol/l Ca minimal um 10% ab.

Die Dosis-Effektkurve der Ca^{++} -Wirkung in Gegenwart von Ip ist ähnlich der der Spontankontraktionen annähernd parallel zu höheren $[Ca^{++}]$ verschoben. Das Maximum der Kurve wird wie in Abwesenheit von Ip bei 10^{-2} Mol/l Ca erreicht und liegt nur um 10% niedriger. Die beiden Kurven konvergieren ebenfalls bei $2,2 \times 10^{-2}$ Mol/l Ca.

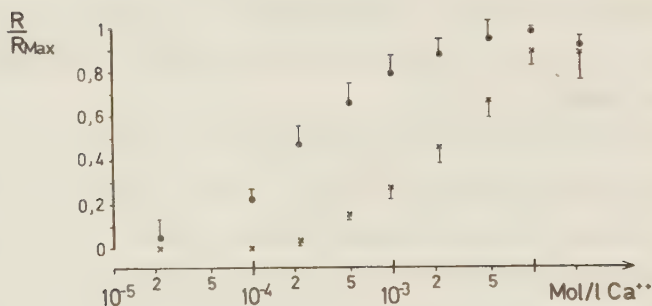


Abb. 7: Durch K_2SO_4 -Locke induzierte phasische Kontraktionen in Abhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ ohne (●) und in Gegenwart (x) von 3×10^{-7} Mol/l Ip. Mittelwerte, Standardabweichungen für $n=6$ ohne Ip und $n=4$ mit Ip siehe Tab. I. Die Standardabweichungen sind nur in einer Richtung aufgetragen.

Der Zeitgang der Versuche ist im Text erläutert.

Temperatur: $35^\circ C$

Die Abb. 8 zeigt die lineare Transformation nach Lineweaver und Burk. Es sind die reziproken Werte der Kaliumkontraktionen (Ordinate) gegen die reziproken Werte der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ (Abszisse) aufgetragen. Dabei sind die

Tab. I: Durch K_2SO_4 -Locke-Lösung induzierte phasische Kontraktionen in Abhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ bezogen auf die bei optimaler $[Ca^{++}]$ erzielte Kontraktion mit Angabe der Mittelwerte (x) und der Standardabweichungen (s_x)

Zeitverläufe bei Lösungswechsel siehe Text

Temperatur: $35^\circ C$

Versuch	[Ca ⁺⁺] Mol/l	10 ⁻⁵ 2,2	1	10 ⁻⁴ 2,2 5	1	10 ⁻³ 2,2	5	1	10 ⁻² 2,2
1		0	21	49	73	86	93	100	99
2		11,5	16	37	60	81	92	99,5	100
3		6	24	60,5	79,5	88	93	100	99
4		22	23	49,5	63	76	84,5	92,5	100
5		0	27,5	41	64	80	90	99	100
6		0	16,5	50,5	60	69,5	79	85	96
x		4,92	21,4	47,92	66,58	80,08	88,58	94,92	99
s _x		8,68	4,54	8,19	7,93	6,74	5,68	8,54	1,55
in Gegenwart von 3x10 ⁻⁷ Mol/l Ip									
3		0	0	5,9	17,9	33,7	53,5	71	90
4		0	0	0	14,5	29,2	51,5	76	96
5		0	0	4,8	16	24,5	40,5	61	81
6		0	0	2,5	12,6	23	38	62	95
x		0	0	3,3	15,28	27,6	45,88	67,5	90,5
s _x		0	0	2,62	2,24	4,85	7,76	7,23	6,86

Kontraktionswerte relativiert, indem sie auf den größten bezogen sind. Die aus den Meßwerten errechneten Regressionsgeraden schneiden die Ordinate fast bei 1. Die beiden Geraden unterscheiden sich deutlich in ihrer Steigung. Dies ist typisch für einen kompetitiven Antagonismus.

Aus dem Schnittpunkt beider Geraden mit der Abszisse ergeben sich die beiden K_M -Werte. Das sind diejenigen $[Ca^{++}]_{e.c.}$, die für eine halbmaximale Kontraktion notwendig sind. Ohne Ip beträgt sie $2,3 \times 10^{-4}$ Mol/l Ca, in Gegenwart des Ca-Hemmstoffes (3×10^{-7} Mol/l Ip) dagegen beträgt die $[Ca^{++}]$ der "Halbsättigung" $3,1 \times 10^{-3}$ Mol/l, ist also um 13,5mal größer.

7. Ca^{++} -und Iproveratrilwirkung auf den phasischen und den tonischen Teil der Kontraktion

Verbringt man einen Streifen der Taenia coli in ein Medium, in dem durch isotonen Ersatz des NaCl der Locke-Lösung durch K_2SO_4 eine vollständige Depolarisation des transmembranalen Potentials bewirkt wird, so kontrahiert sich der Muskel mit einem charakteristischen Zeitverlauf. Sofort nach Gabe von K_2SO_4 -Locke-Lösung kontrahiert das Präparat schnell bis zur Gipfelspannung, um dann rasch wieder auf ein geringeres Spannungsniveau abzufallen. Der anfänglichen phasischen Kontraktion schließt sich eine tonische Kontraktur an mit einem zweiten deutlich niederen Gipfel, der in ein fast gleichbleibendes Spannungsplateau übergeht. Dies Verhalten zeigt die Abb.9.

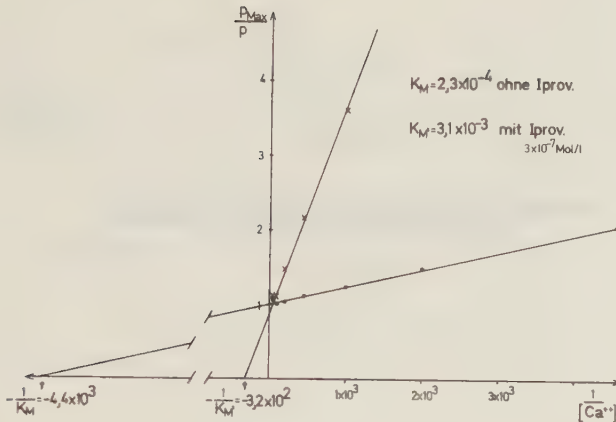


Abb.8: Doppelt reziproke Auftragung der phasischen Kontraktionen nach K_2SO_4 -Locke gegen die $[Ca^{++}]_{e.c.}$ ohne (•) und in Gegenwart (x) von 3×10^{-7} Mol/l Ip nach Lineweaver und Burk

Die eingezeichneten Geraden sind die aus den Werten errechneten Regressionsgeraden.

	ohne Ip	mit Ip
x :	$4,43 \times 10^3$	$3,22 \times 10^2$
y :	1,006	0,8945
Steigung:	0,2318	2,787

P_{Max} . ist die bei der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ von 10^{-2} Mol/l erreichte maximale Kontraktion.

Wie Messungen der elektrischen Aktivität simultan zu isometrischen Kontraktionen, die durch K_2SO_4 -Locke-Lösung ausgelöst wurden, ergeben haben (Riemer et al. 1973), ist der phasische Teil von einer AP-Serie hoher Frequenz begleitet. Sie ist durch die rasche Depolarisation der Membran der glatten Muskelzelle ausgelöst. Dagegen verharret während der tonischen Kontraktur die Membran in

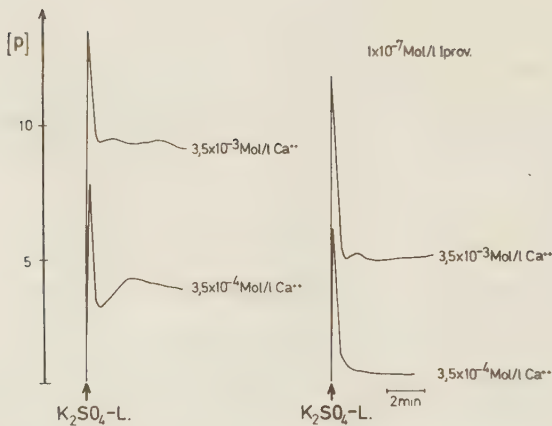


Abb.9: Wirkung verschiedener $[Ca^{++}]$ ohne und mit Ipro= veratrill (10^{-7} Mol/l) auf die durch K_2SO_4 -Locke induzierten Kontraktionen

Temperatur: $35^{\circ}C$

vollständiger Depolarisation. AP können nicht mehr auftreten, weil Depolarisationsblock besteht. Dieses Verhalten zeigt die freundlicherweise von Herrn Dr.Riemer zur Verfügung gestellte Abb.10. Mittels intrazellulärer Ableittechnik wird das Ansteigen des MP (Membranpotential) und das damit verbundene Auftreten von AP-Salven bei Senkung der $[K^+]_{e.c.}$ von 59 auf 17,7 mMol/l und das Absinken des MP gegen 0 und damit das Sistieren der AP-Entladungen bei Erhöhung der $[K^+]_{e.c.}$ von 17,7 auf 59 mMol/l gezeigt (Depolarisationsblock). Die $[Ca^{++}]_{e.c.}$ beträgt $2,5 \times 10^{-3}$ Mol/l.

Es erscheint möglich, daß die phasische Kontraktion eine durch AP induzierte vorübergehende Zunahme von Ca^{++} im

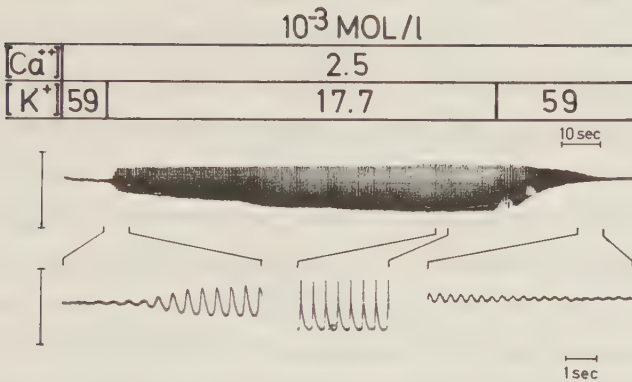


Abb.10: Intrazelluläre Ableitung aus einer Muskelzelle der isolierten Taenia coli bei verschiedenen $[K^{+}]_{e.c.}$
 obere Registrierung: Abhängigkeit der AP-Entladungen von der Höhe des MP (Man beachte ganz rechts das Sistieren der AP im Depolarisationsblock.)
 untere Registrierung: Ausschnitte aus der oberen Registrierung mit gespreizter Zeitachse
 Krebs-Lösung bei $36^{\circ}C$
 (Dieses Bild wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Riemer zur Verfügung gestellt.)

myoplasmatischen Raum widerspiegelt, die in dem Maße zurückgeht, wie die Membran unfähig wird, AP auszusenden, also mit Auftreten des Depolarisationsblockes. Die plateauartige Kontraktur dagegen reflektiert eine andauernde Erhöhung der kontraktionswirksamen $[Ca^{++}]$ im Myoplasma als Folge eines neuen Gleichgewichtes zwischen dem durch die depolarisierte Membran verstärkten Ca^{++} -Einstrom und den das Ca auswärts transportierenden Mechanismen. Über die Herkunft der wirksamen Ca^{++} im myoplasmatischen

Raum kann zunächst noch nichts ausgesagt werden.

Um diese Annahme zu prüfen, haben wir ähnlich wie Durbin et al. (1961) einen Taenienstreifen nach Ca-Entzug mit K_2SO_4 -Locke-Lösung depolarisiert. Dabei wird das Abfeuern von AP während der Depolarisation verhindert. Dem depolarisierten Präparat werden danach Ca^{++} in normaler Konzentration angeboten. Dieses Verhalten wird in Abb. 11 Bildteil A wiedergegeben. Die durchgezogene Registrierung (b) zeigt, daß bei Unterbindung der depolarisationsbedingten AP-Serie die phasische Kontraktion nicht auftritt. Die gestrichelte Linie (a) beweist das normale Verhalten desselben Präparates. Wenn es in Gegenwart von Ca^{++} mit K_2SO_4 -Locke-Lösung depolarisiert wird, treten phasische und tonische Antwort wieder nacheinander auf. Bildteil B der Abb. 11 zeigt die Wirkung des Ip auf phasischen und tonischen Teil der Kontraktion. Wird das Präparat, das auch in 3×10^{-7} Mol/l Ip mit geringeren Hubhöhen spontan aktiv ist, der gleichen Prozedur unterworfen, wie sie in Bildteil A beschrieben ist, verschwindet die tonische Kontraktur. Dies ist sowohl der Fall, wenn in Ca^{++} -Gegenwart depolarisiert wird (gestrichelte Registrierung [a]) als auch, wenn dies unter Ca^{++} -Entzug (durchgezogene Registrierung [b]) geschieht. Wie zu erwarten, zeigt die Registrierung B a eine um 20% reduzierte phasische Antwort im Vergleich zu A a, da Ip bei Ca^{++} -Gegenwart nur die Frequenz der AP mindert und damit die tetanische Antwort der phasischen Kontraktion beeinträchtigt.

Die Ca^{++} -Abhängigkeit der phasischen und der tonischen Antwort ohne und in Gegenwart von 10^{-7} Mol/l Ip wird an

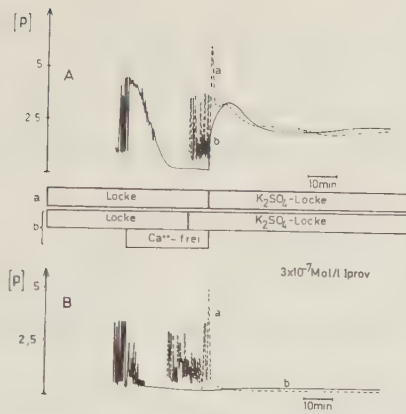


Abb.11: Zeitlicher Spannungsverlauf ohne und in Gegenwart von $3 \times 10^{-7} \text{ Mol/l Ip}$

- a) in Normalbad (Locke-Lösung) und bei Kalium-Depolarisierung (K_2SO_4 -Locke-Lösung) = gestrichelte Linie
- b) in Normalbad, bei Ca-Entzug und bei K-Depolarisierung ohne und mit Ca = durchgezogene Registrierung

7 Präparaten untersucht. Die Abb.12 zeigt die Ergebnisse in halblogarithmischer Darstellung. Dabei wird das Präparat zunächst durch Entzug der austauschbaren Ca^{++} zur totalen Erschlaffung gebracht. Dann wird die niedrigste $[Ca^{++}]$ zugefügt. Nach 15 Min. wird durch isotone K_2SO_4 -Locke, die die jeweils entsprechende $[Ca^{++}]$ enthält, depolarisiert. Dies wird in 13 Schritten ansteigender $[Ca^{++}]$ wiederholt:

$8,75 \times 10^{-5} \text{ Mol/l}$	$2,2 \times 10^{-3} \text{ Mol/l}$
$1,39 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$	$3,48 \times 10^{-3} \text{ Mol/l}$
$2,2 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$	$5,53 \times 10^{-3} \text{ Mol/l}$
$3,48 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$	$8,75 \times 10^{-3} \text{ Mol/l}$
$5,53 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$	$1,39 \times 10^{-2} \text{ Mol/l}$
$8,75 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$	$2,2 \times 10^{-2} \text{ Mol/l}$
$1,39 \times 10^{-3} \text{ Mol/l}$	

Anschließend wird der gesamte Versuch noch einmal in Gegenwart von 10^{-7} Mol/l Ip durchgeführt.

Die erzielten Spannungen in der Ca-Konzentrationsreihe ohne (●) und mit Ip (x) sind sowohl für die phasische Kontraktion (oberer Bildteil) als auch für die tonische Kontraktur (unterer Bildteil) in der Abb.12 dargestellt. Die gemessenen Spannungen (R) werden auf die bei optimaler $[Ca^{++}]$ ohne Inhibitor gemessene R_{Max} bezogen. Die Spannung der tonischen Kontraktur wird im Zeitbereich zwischen 1. und 11. Min. nach Gabe der K_2SO_4 -Locke-Lösung graphisch gemittelt, soweit das Plateau keine eindeutige Konstanz besitzt. In der Tab.II sind die erhaltenen Meßwerte aufgeführt, aus denen die Kurven der Abb.12 gezeichnet sind. Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben.

Die Dosis-Wirkungsbeziehungen bei der phasischen Kontraktion und der tonischen Kontraktur ohne und in Gegenwart von Iproveratril werden nach Lineweaver und Burk aufgetragen. (Abb.13a und b)

Ein Vergleich der K_M -Werte des phasischen Teils der in

Tab.II: Durch K_2SO_4 -Locke induzierte phasische (IIa) und tonische (IIb) Kontraktionen in Abhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ bezogen auf die bei optimaler $[Ca^{++}]$ erzielte Kontraktion mit Angabe der Mittelwerte (x) und der Standardabweichungen (s_x)

Zeitverläufe bei Lösungswechsel siehe Text

Die Höhe der tonischen Kontrakturen wurde durch graphische Mittelung im Bereich zwischen der 1. und 11. Min. nach Gabe von K_2SO_4 -Locke bestimmt.

Temperatur: $35^{\circ}C$

($\underline{a}$) vers.	[Ca ⁺⁺] Mol/l		10 ⁻⁵		10 ⁻⁴		10 ⁻³		10 ⁻²			
	1,39	2,2	3,48	5,5	8,75	1,39	2,2	3,48	5,5	8,75	1,39	2,2
1	-	34	57	76,5	88	91,5	95,5	100	88	81,5	80	-
2	13	69,5	-	83	87,5	86	87	92,5	100	95	90	90,5
3	15	21	48	61	78	81	93	91	99	94	100	95
4	12	37,5	45,5	62,5	54,5	68,5	83,5	87	92,5	100	81,5	-
5	26	51	64	73	92,5	100	84	85	85,5	91	85	69
6	-	48	51,5	75,5	88,5	93	96,5	100	96,5	96	91	-
7	39	61	71	73	86,5	89	91,5	85,5	93	91	84	74,5
x	21	48	52,3	69,28	80,57	86,57	89,43	90,64	93,21	95,3	92,71	87,36
s _x	11,5	17,2	13,3	9,3	12,85	9,89	4,96	5,93	5,87	4,3	5,86	6,89
in Gegenwart von 10 ⁻⁷ Mol/l Ip												
1	-	-	-	41,5	40,5	49	63	73,5	85	86,5	74,5	70,5
2	-	-	-	44	48,5	60,5	-	89,5	97	99	96	91,5
3	-	-	-	31	42	57	71	82	89,5	91,5	92	85
4	-	-	-	22,5	33	48	62,5	83	83,5	89	81	77
5	-	-	-	24,5	29,5	38,5	49	64,5	74	82,5	77,5	73,5
6	-	-	-	21,5	24,5	49	80	89,5	96,5	97,5	98	89
7	-	-	-	22	22	34	48	60	74,5	80,5	80	74,5
x	-	-	-	29,57	34,28	48	62,25	77,43	85,71	89,5	85,57	80,14
s _x	-	-	-	9,58	9,75	9,36	12,41	11,76	9,37	7,0	9,52	8,26

(Vers.)	[Ca ⁺⁺] Mol/l	10 ⁻⁵			10 ⁻⁴			10 ⁻³			10 ⁻²		
		1,39	2,2	3,48	5,5	8,75	1,39	2,2	3,48	5,5	8,75	1,39	2,2
1		-	5,5	27	49	53	63	65,5	67,5	68,5	70,5	71	-
2		0	-	27,5	37,5	46	57	64,5	71,5	76	76	81	78
3		0	9	26,5	42	51	70	70	75	74	76	77,5	73
4		0	1,5	8,5	26	31,5	40	57	61	72	79	86	-
5		0	6	23,5	52	68	69	70	62,5	68	77,5	79	80
6		-	3	34,5	55	75	75,5	73	73,5	72	79	84,5	-
7		0	7	9,5	39	60	81	80,5	69	68	73	75	74
x		0	3,7	9,8	33	49	59,28	67,4	67,57	70	72,9	76,85	78,85
s _x		0	2,9	7,1	9,6	12,9	15,6	8,9	4,08	4,28	3,9	4,7	5,18
in Gegenwart von 10 ⁻⁷ Mol/l Ip													
1		-	-	0	1,5	3,5	8	17	32,5	49,5	56,5	64	69
2		-	-	-	2	4	-	11	21	28	37	46	57
3		-	-	0	1	2,5	8	16	26,5	36,5	48	61	68,5
4		-	-	0	0	2	5,5	12	23	35,5	43,5	58	71
5		-	-	0	1	2	4	10	16	26	34	46,5	57,5
6		-	-	0	0	0	3,7	8	20	32	45,5	58	71
7		-	-	0	0	3,5	4	7	10,5	21	30,5	41	56,5
x		-	-	0	0,78	2,5	5,5	11,57	21,35	32,6	42,14	53,5	64,35
s _x		-	-	0	0,8	1,35	2	3,78	7,09	9,2	8,96	8,83	6,95

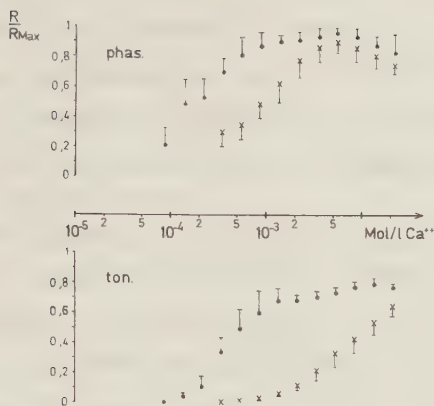


Abb.12: Durch K_2SO_4 -Locke induzierte phasische und tonische Kontraktionen in Abhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ ohne (●) und mit (x) Ip (10^{-7} Mol/l) Mittelwerte, Standardabweichungen für $n=5-7$ siehe Tab.II. Die Standardabweichungen sind nur in einer Richtung aufgetragen. Der Zeitgang ist im Text erläutert. Temperatur: $35^{\circ}C$

Abb.12 bzw. 13a dargestellten Versuche mit dem phasischen Teil der in Abb.7 bzw. 8 registrierten Messungen (beide ohne Ip) überrascht wegen ihrer unterschiedlichen Höhe: aus Abb.13a folgt K_M -Wert = $9,89 \times 10^{-5}$ Mol/l Ca, aus Abb.8 dagegen $2,29 \times 10^{-4}$ Mol/l Ca, also ein 2,31-fach höherer Wert.

Vergleicht man den phasischen und den tonischen Anteil der nicht gehemmten mechanischen Antwort in Abb.12 und 13a und b miteinander, so fällt auf:

1. die tonische Kontraktur hat eine höhere Ca-Schwellenkonzentration und einen größeren K_M -Wert

($3,15 \times 10^{-4}$ Mol/l Ca),

2. das tonische Kontrakturmaximum liegt bei wesentlich höheren $[Ca^{++}]$ als das phasische Maximum,
3. die Hemmung der tonischen Kontraktur durch hohe $[Ca^{++}]$ ist geringer als die der phasischen Kontraktion.

In der Tab.III sind die relativen Mittelwerte für die phasische und die tonische Antwort ohne und in Gegenwart von 10^{-7} Mol/l Ip in den Kolonnen 2-5 angegeben. Dabei ist der Bezugswert für die phasische Kontraktion die bei der $[Ca^{++}]_{e.c.} = 5,5 \times 10^{-3}$ Mol/l erreichte und für die tonische Kontraktur die bei $1,39 \times 10^{-2}$ Mol/l gemessene isometrische Spannungsentwicklung. Die Kolonnen 6 und 7 geben die prozentuale Hemmwirkung des Ip für die phasische (Abb.14 Kurve a) und die tonische (Abb.14 Kurve b)

Abb.13a und b: Doppelt reziproke Auftragung der phasischen (oben) und der tonischen (unten) Kontraktionen nach K_2SO_4 -Locke-Gabe gegen die $[Ca^{++}]_{e.c.}$ ohne (●) und in Gegenwart (x) von Ip nach Lineweaver und Burk
Die eingezeichneten Geraden sind die aus den Werten errechneten Regressionsgeraden.

phasischer Teil:	ohne Ip	mit Ip
	x: $1,01 \times 10^4$	$1,27 \times 10^3$
	y: 1,0275	1,0250
	Steigung: 0,1015	0,8085
tonischer Teil:		
	x: $3,18 \times 10^3$	$7,165 \times 10^1$
	y: 0,9979	0,7215
	Steigung: 0,3140	10,0691

p_{Max} (phasischer Teil) ist die bei der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ von $5,5 \times 10^{-3}$ Mol/l erreichte maximale Kontraktion

p_{Max} (tonischer Teil) ist die bei der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ von $1,39 \times 10^{-2}$ Mol/l erreichte maximale Kontraktion

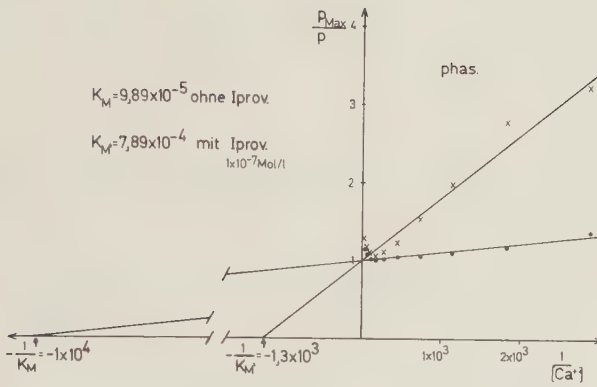


Abb. 13a

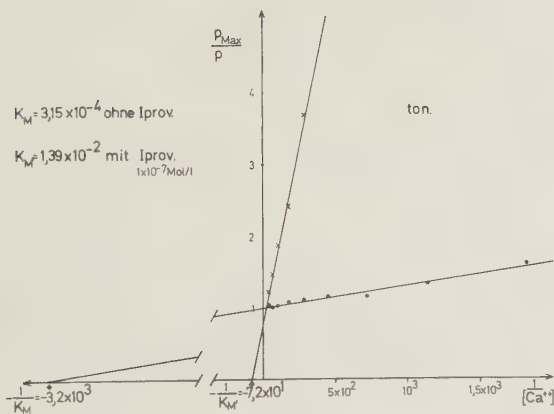


Abb. 13b

Antwort wieder. Die Abb.14 gibt in Kurve c die aus der Kolonne 8 der Tab.III entnommenen Werte an. Sie spiegeln die prozentuale Hemmwirkung des Ip auf die tonische Kontraktur relativ zur phasischen Kontraktion bei den verschiedenen $[Ca^{++}]_{e.c.}$ wider. Hierzu gehört die rechte Ordinate der Abb.14.

Der Vergleich des phasischen mit dem tonischen Teil der mechanischen Antwort des Taenienpräparates in Gegenwart von Ip in den Abb. 12,13 und 14 zeigt:

1. höhere Ca-Schwellenkonzentration und größerer K_M -Wert für die tonische Kontraktur ($1,39 \times 10^{-2}$ Mol/l Ca),
2. ein tonisches Kontrakturmaximum wird bei den von uns verwendeten $[Ca^{++}]$ nicht erreicht,
3. bei niedrigen $[Ca^{++}]$ ist die Hemmung durch Ip (10^{-7} Mol/l) für die tonische Antwort fast doppelt so groß wie für die phasische Antwort.

8. Temperaturabhängigkeit induzierter Kontraktionen

Es werden bei $35^{\circ}C$ und danach bei $26,5^{\circ}C$ isometrische Kalium-Kontraktionen in Gegenwart von $2,2 \times 10^{-3}$ Mol/l Ca ausgelöst. Die Abb.15 und 16 zeigen, daß die phasische Kontraktion durch Temperatursenkung begünstigt wird,

Tab.III: Hemmwirkung von Ip (10^{-7} Mol/l) auf durch K_2SO_4 -Locke induzierte phasische und tonische Kontraktionen. Kolonnen 2-5 zeigen die relative Kontraktionskraft in % der maximalen.

Kolonnen 6 und 7 zeigen die Hemmwirkung von Ip in % der Kontrollkontraktionen.

Kolonne 8 zeigt den Quotienten der Hemmwirkung ton./phas.

1	2	3	4	5	6	7	8
[Ca ⁺⁺] Mol/l	rel. Kontraktion in % der maximalen				% Hemmung		
	ohne Iproveratril		mit Iproveratril		durch Iproveratril		Hemmung: ton./phas.
	x'phas.	x'ton.	x'phas.	x'ton.	x'phas.	x'ton.	
3,48x10 ⁻⁴	72,7	41,85	31,03	0	57,3	100	1,74
5,5 x10 ⁻⁴	84,55	62,14	35,97	0,98	57,4	98,5	1,72
8,75x10 ⁻⁴	90,84	75,18	50,37	3,17	44,5	95,8	2,15
1,39x10 ⁻³	93,81	85,47	65,32	6,97	30,2	91,9	3,05
2,2 x10 ⁻³	95,12	85,69	81,25	14,67	14,6	82,8	5,67
3,48x10 ⁻³	97,81	88,77	89,94	27,07	7,8	69,5	8,9
5,5 x10 ⁻³	100	92,45	93,92	41,34	6,0	55,5	9,25
8,75x10 ⁻³	97,29	97,46	89,79	53,44	7,8	45	5,78
1,39x10 ⁻²	91,67	100	84,1	67,85	8,2	32,15	3,9
2,2 x10 ⁻²	86,31	97,01	77,51	81,61	10,5	15,8	1,51

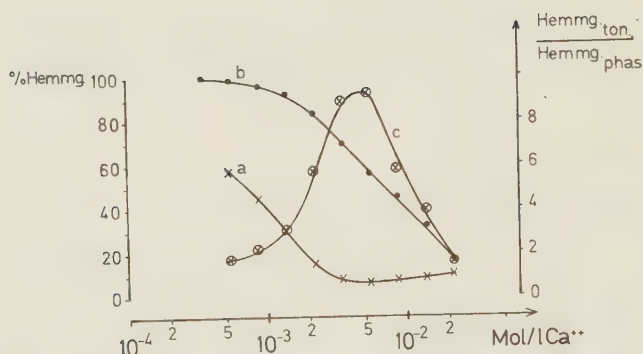


Abb.14: Hemmung des phasischen (a) und des tonischen (b) Anteils der K_2SO_4 -Kontraktur (linke Ordinate) durch Ip (10^{-7} Mol/l) in Abhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$. Kurve c mit rechter Ordinate: Quotient aus den Meßwerten der Kurven a und b

Es sind jeweils die Mittelwerte ($n=6$ bzw. $n=4$ Einzelmessungen) dargestellt.

die tonische Kontraktur in den ersten 10 Min. gehemmt wird. Nach etwa 45 Min. jedoch beträgt die tonische Kontraktur bei $26,5^{\circ}C$ 138% derjenigen bei $36^{\circ}C$. Außerdem verschwinden die beim Übergang von phasischer auf tonische Kontraktion beobachteten Tonusschwankungen.

Edman et al. (1961,1962) haben ihren Befund, zur K^{+} -Kontraktur durch ACh eine Zusatzspannung zu erzielen, mit einer durch ACh hervorgerufenen Freisetzung intrazellulär gebundener Ca^{++} zu erklären versucht. Bülbring (1955) hat die Ähnlichkeit von ACh- und Histaminwirkungen auf glatte Muskelzellen hervorgehoben. Wir haben des=

halb die Temperaturabhängigkeit der durch Histamin verursachten Zusatzkontraktionen K^+ -depolarisierter Taenienpräparate geprüft.

Die Abb.16 zeigt, wie die seit 50 Min. bestehende tonische Kontraktur durch 1-minütige Zugabe ansteigender Histaminkonzentrationen noch vergrößert werden kann. Der Effekt der zusätzlichen kontraktilen Aktivierung ist bei $26,5^{\circ}\text{C}$ deutlich größer als bei 35°C und zeigt bei 10^{-4} Mol/l Histamin ihr Maximum für beide Temperaturen (14% zusätzliche Aktivierung bei $26,5^{\circ}\text{C}$ und 8% bei 35°C). Die Histamin-Schwellenkonzentration, die gerade eine zusätzliche Kontraktur erkennen läßt, steigt von 3×10^{-6} auf 3×10^{-5} Mol/l, wenn die Temperatur von $26,5^{\circ}\text{C}$ um $8,5^{\circ}\text{C}$ erhöht wird.

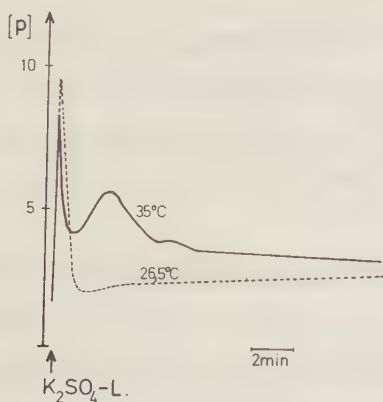


Abb.15: Wirkung von 2 verschiedenen Temperaturen auf die durch K_2SO_4 -Locke-Gabe induzierten Kontraktionen

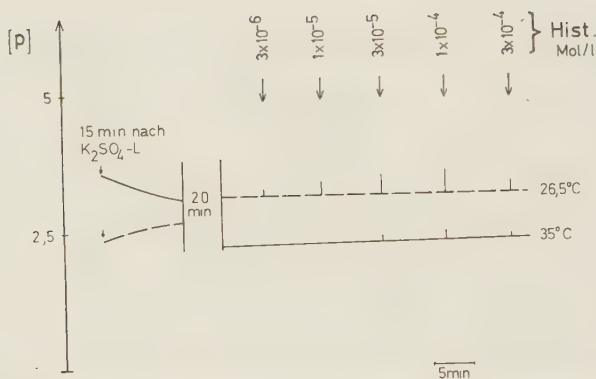


Abb.16: Kontraktionszuwachs durch verschiedene [Histamin] an der durch K_2SO_4 -Locke vollständig depolarisierten Membran bei 2 verschiedenen Temperaturen (Symbolisierung des Kontraktionszuwachses zur tonischen Kontraktur durch senkrechte Strecken)

Temperaturerniedrigung hat also auch auf die durch Histamin hervorgerufenen Zusatzkontraktionen der durch Kalium depolarisierten Taenienzellen eine die Kontraktionskraft fördernde Wirkung.

9. ACh-Wirkung auf die durch K^+ depolarisierten Taenienstreifen

Die durch Edman et al.(1961,1962) vorgeschlagene Erklärung der ACh-bedingten Zusatzspannung zur K^+ -Kontraktur durch die Wirkung vermehrt freigesetzter Ca^{++} , hat uns veranlaßt, die Wirkung des Ca-Antagonisten Iproveratril auf die zusätzliche Aktivierung zu untersuchen.

Diese Versuche werden jeweils an einem Präparat durchgeführt, um die Unterschiede der Kontraktionskraft verschiedener Taenienpräparate zu umgehen.

Zunächst wird eine konstante K^+ -Kontraktur abgewartet. Sie ist nach 18 Min. erreicht. Dann wird dem Präparat jeweils 2,5 Min. lang ACh in den in der Abb.17 vermerkten Konzentrationen angeboten. Zwischen den ACh-Perioden liegen jeweils 5 Min. währende Waschperioden, während der mit Locke-Lösung das ACh aus dem Präparat entfernt wird. Um eine möglichst hohe ACh-Wirkung zu erzielen, wird bei $20,2^{\circ}\text{C}$ untersucht.

Die Abb.17 zeigt die zusätzlichen ACh-bedingten Aktivierungen. Ihr Maximum bei 3×10^{-5} Mol/l ACh beträgt 26% der Ausgangskontraktionsspannung.

Bevor die gleiche Prozedur in Gegenwart von 10^{-7} Mol/l Iproveratril abläuft, wird das Präparat 45 Min. lang in normaler Locke-Lösung, die diese [Ip] enthält, inkubiert. In Gegenwart des Ca^{++} -Hemmers beträgt die zusätzliche ACh-Aktivierung 33% der bei Iproveratril-Gegenwart noch bestehenden tonischen Kontrakturspannung. Dem Betrag nach mindert Ip die ACh-Zusatzkontraktur um die Hälfte.

10. Abhängigkeit der ACh-bedingten Zusatzkontraktur von der extrazellulären $[\text{Ca}^{++}]$

Die Abhängigkeit der ACh-bedingten Zusatzkontrakturen von der $[\text{Ca}^{++}]_{\text{e.c.}}$ wird in 2 Versuchen geprüft. Nach 30-minütiger Äquilibration des Taenienpräparates in normaler Locke-Lösung wird das Ca entzogen, bis das Präparat nach 20 Min. vollständig relaxiert ist. Dann wird K_2SO_4 -Locke-

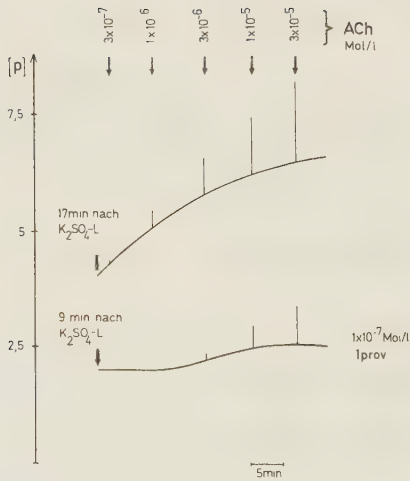


Abb.17: Kontraktionszuwachs durch ACh an der durch K_2SO_4 -Locke vollständig depolarisierten Membran ohne und in Gegenwart von Ip (10^{-7} Mol/l) (Symbolisierung des Kontraktionszuwachses zur tonischen Kontraktur durch senkrechte Strecken)

Die Kurve ohne Ip beginnt 17 Min., die mit Ip 9 Min nach Zugabe von K_2SO_4 -Locke.

Temperatur: $20,2^{\circ}C$

Lösung gegeben, die jeweils die $[Ca^{++}]$ enthält, deren Wirkung geprüft werden soll. Nach Verstreichen des phasischen Kontraktionsteiles wird im Plateau der tonischen Kontraktur ACh (3×10^{-5} Mol/l) zugesetzt. Anschließend erfolgt 15 Min. lang Äquilibration in normaler Locke.

Danach wird K_2SO_4 -Locke mit der nächst höheren $[Ca^{++}]$ zugegeben.

Folgende $[Ca^{++}]$ werden verwendet:

$2,2 \times 10^{-5}$ Mol/l	$2,2 \times 10^{-3}$ Mol/l
$9,5 \times 10^{-5}$ Mol/l	$9,5 \times 10^{-3}$ Mol/l
$5,2 \times 10^{-4}$ Mol/l	

Das Ergebnis zeigt die Abb. 18. Es sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen eingezeichnet.

Der phasische (●) und der tonische Teil (o) der Kontraktion zeigen die uns bereits bekannte Abhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$.

Die zusätzlich zur tonischen Kontraktur durch ACh erzielten Extrakontrakturen (x) zeigen ein anderes Verhalten. So finden wir einen konstanten Kontraktionszuwachs durch ACh zur tonischen Kontraktur von ca. 30% der maximalen phasischen Kontraktion im Bereich der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ von 0 bis $5,2 \times 10^{-4}$ Mol/l. Bei weiter ansteigender $[Ca^{++}]$ tritt eine geringe Abnahme ein.

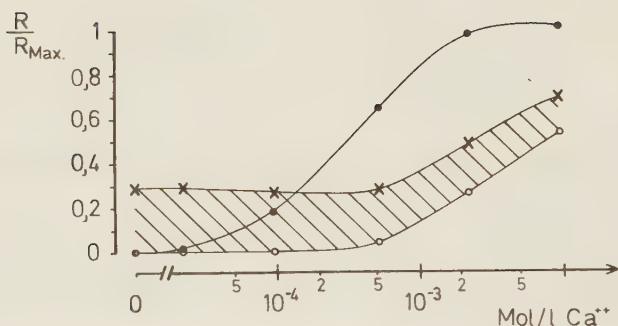


Abb. 18: Abhängigkeit der phasischen (●) und der tonischen (o = ohne ACh, x = mit 3×10^{-5} Mol/l ACh) Kontraktion von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$.

Ordinate: Kontraktionsmaxima in % zum Kontraktionsmaximum bei optimaler $[Ca^{++}]$

Abszisse: $[Ca^{++}]_{e.c.}$.

Die $[Ca^{++}]$ werden kumulativ erhöht, und nach jeweils 15 Min. Inkubation wird die normale Locke durch K_2SO_4 -Locke ersetzt. Nachdem die tonische Kontraktur das Minimum (Plateau) erreicht hat, wird ACh in der konstanten Konzentration von 3×10^{-5} Mol/l hinzugegeben.

Mittelwerte aus 2 Versuchen

Temperatur: 21°C

Diskussion

Wie in der Einleitung näher erläutert, benutzten wir verschiedene Wege, um hypothetische Ca-Kompartimente zu aktivieren, deren Ca^{++} die Kontraktionen der Taenienzellen auslösen. Es wurde bei Konstanz der Kompartiment-Aktivierungsreize geprüft:

1. die Abhängigkeit der kontraktilen Antwort von der $[\text{Ca}^{++}]_{\text{e.c.}}$, aus der direkt oder indirekt sich die Kompartimente mit Ca^{++} versorgen,
2. die Hemmbarkeit der kontraktilen Antwort durch Ca-Antagonisten bei verschiedenen $[\text{Ca}^{++}]_{\text{e.c.}}$.

Wir erwarteten für den Fall, daß verschiedene Ca-Kompartimente bestehen, bei der Anwendung unterschiedlicher Kontraktionsauslöser charakteristische Unterschiede in der Abhängigkeit der Kontraktion von der $[\text{Ca}^{++}]_{\text{e.c.}}$ und von der Ca-Antagonistenwirkung.

Die Ca-Kompartimente können durch spontane AP zur Ca-Freisetzung aktiviert werden. Dies kann als physiologischer Aktivierungsmechanismus angesehen werden. Er wird im folgenden als AM 1 (Aktivierungsmechanismus 1) bezeichnet. Er liegt in spontan rhythmischen Präparaten vor (AM 1a).

Bei der Kalium-Depolarisierung werden während der Depolarisation vom Ausgangspotential (ca. -50 mV) bis zum Depolarisationsblock bei ca. -30 mV AP-Salven abgefeuert. Sie werden als Auslösungsfaktor für die phasische K^{+} -Kontraktur angesehen. Infolgedessen kann auch diese Kontraktion als durch AM 1 verursacht betrachtet werden (AM 1b).

Als anderer Aktivierungsmechanismus wird die durch K^+ -Dauerdepolarisierung hervorgerufene tonische Antwort angesehen (AM 2). Er muß ebenso wie der AM 1 von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ und von Ca-Antagonisten abhängig sein. Die S-förmigen Dosis-Wirkungskurven der Abb.2,6,7 und 12 rechtfertigen diese Annahmen.

Bei den spontan tätigen Präparaten (AM 1) fiel die ausgeprägte kontraktionsreduzierende Wirkung "überoptimaler" $[Ca^{++}]$ auf. Während bei "überoptimaler" $[Ca^{++}]$ bei AM 1a die Kontraktionsamplitude um 50% reduziert wurde, war bei AM 1b nur ein Spannungsverlust von 10% zu registrieren.

Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied kann in dem Einfluß der AP auf die Aktivierung des funktionell zugehörigen Ca-Kompartimentes gesucht werden. Die Kontraktionskraft hängt von der AP-Frequenz ab. Die AP-Frequenz wiederum ist abhängig von:

1. der Höhe des MP, das durch die $[Ca^{++}]_{e.c.}$ verändert werden kann. So fanden mehrere Autoren (Axelsson et al.1967, Brading et al.1969 und Hurwitz et al.1970) eine hyperpolarisierende Wirkung hoher $[Ca^{++}]_{e.c.}$, und Magaribuchi et al. konnten 1972 sogar ausrechnen, daß eine Erhöhung der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ von normal auf 7,5 mMol/l die Membran um 6-8 mV hyperpolarisiert.
2. einer direkten Wirkung der Ca^{++} auf die AP-Frequenz. Riemer et al. konnten 1973 zeigen, daß die AP-Frequenz durch Senkung der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ erniedrigt werden konnte, obwohl das MP durch Veränderung der $[K^+]$ konstantgehalten worden war.

Die hyperpolarisierende Wirkung "überoptimaler" $[Ca^{++}]$ fällt bei der durch K_2SO_4 -Locke erfolgten Depolarisierung weg, sodaß wir bei AM 1b eine vergleichsweise sehr geringe Abnahme der Kontraktionshöhen bei "überoptimalen" $[Ca^{++}]$ haben.

Um die Beeinflussung von AM 1a und AM 1b durch Ca-Antagonisten zu untersuchen, stellten wir Ca-Dosis-Wirkungskurven an spontan tätigen Präparaten und an durch K_2SO_4 -Locke zur phasischen Kontraktion gebrachten Präparaten in Gegenwart von 3×10^{-7} Mol/l Ip auf. Dabei ergab sich in beiden Fällen ein ähnlicher Kurvenverlauf. So fanden wir im Vergleich zur Kurve ohne Ip eine größere Schwellenkonzentration, einen nahezu parallelen Kurvenverlauf im aufsteigenden Schenkel und ein Überschneiden der Kurven ohne und mit Ip bei sehr hohen $[Ca^{++}]_{e.c.}$, d.h. eine Rechtsverschiebung zu höheren $[Ca^{++}]$ hin.

Die Kurven mit Ip zeigen ein Maximum, das bei den spontanen Kontraktionen weiter als bei den K_2SO_4 -Locke Kontraktionen vom Kontraktionsmaximum der Kurve ohne Ip entfernt ist. Dies erklärt sich wiederum aus dem Wegfall der hyperpolarisierenden Wirkung "überoptimaler" $[Ca^{++}]$ am schon vordepolarisierten Präparat.

Diese eben beschriebenen Kurvenverläufe, die in den Abb. 6, 7 und 12 (oberer Teil) dargestellt sind, lassen deshalb den Schluß zu, daß ein kompetitiver Antagonismus zwischen Ca und Ip vorliegt. Zur Bestätigung und Überprüfung dieser Folgerung stellten wir die Dosis-Wirkungskurven der durch K_2SO_4 -Locke induzierten Kontraktionen

in der Auftragung nach Lineweaver und Burk dar. (Abb.8 und 13a)

Der fast identische Schnittpunkt der Kurven mit und ohne Ip mit der Ordinate legt nahe, daß Ip ein kompetitiver Antagonist der Ca^{++} bei deren Wirkung auf die isometrische Kraftentwicklung ist.

Haeusler (1972) fand an der depolarisierten Pulmonalarterie des Kaninchens einen kompetitiven Antagonismus zwischen Ca und Ip. Er errechnete, daß 1 Molekül Ip 4000 Moleküle Ca antagonisieren kann.

Ein Vergleich der K_M -Werte der Abb.8 und 13a ergibt, daß die $[\text{Ca}^{++}]_{e.c.}$ in Gegenwart von 3×10^{-7} Mol/l Ip um $2,87 \times 10^{-3}$ Mol/l (Abb.8) und in Gegenwart von 1×10^{-7} Mol/l Ip um $6,8 \times 10^{-4}$ Mol/l (Abb.13a) erhöht werden muß, um denselben Effekt zu erzielen wie in Abwesenheit von Ip. Daraus kann man errechnen, daß 1 Molekül Ip ca. 10 000 (Abb.8) bzw. 6 800 (Abb.13a) Moleküle Ca neutralisieren kann.

In der durch langdauernde Gabe von K_2SO_4 -Locke hervorgerufenen tonischen Kontraktur sehen wir einen anderen Aktivierungsmechanismus (AM 2). K_2SO_4 -Locke-Gabe ruft zunächst eine kurze phasische Kontraktion hervor. Sie ist elektrophysiologisch durch das Abfeuern von AP gekennzeichnet (AM 1b). Sie dauert ca. 1 Min. Anschließend verharrt die Membran im Depolarisationsblock (AM 2), welcher sich mechanisch in einer Kontraktur widerspiegelt (Depolarisationskontraktur).

Da wir bei der Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve für die durch AM 2 ausgelöste Kontraktur die Möglichkeit hatten, am selben Präparat auch durch AM 1b induzierte Kontraktionen zu beobachten, stellten wir die entsprechende Dosis-Wirkungskurve auf.

Vergleicht man die Dosis-Wirkungskurven der phasischen Kontraktionen (AM 1) und der tonischen Kontrakturen (AM 2) miteinander (Abb.12), so fällt auf:

1. höhere Ca-Schwellenkonzentration der tonischen Kontraktur,
2. tonisches Kontrakturmaximum liegt bei höheren $[Ca^{++}]$,
3. Hemmung der tonischen Kontraktur durch "überoptimale" $[Ca^{++}]$ ist geringer als die der phasischen Kontraktion.

Ein Vergleich des phasischen (AM 1) mit dem tonischen Teil (AM 2) der Kontraktion in Gegenwart von 10^{-7} Mol/l Ip in den Abb. 12 und 13 zeigt:

1. höhere Ca-Schwellenkonzentration der tonischen Kontraktur,
2. ein tonisches Kontrakturmaximum wird bei den von uns verwendeten $[Ca^{++}]$ nicht erreicht,
3. bei niedrigen $[Ca^{++}]$ werden die durch AM 2 hervorgerufenen tonischen Kontrakturen fast doppelt so stark gehemmt wie die durch AM 1 hervorgerufenen phasischen Kontraktionen.

Die lineare Transformation der Dosis-Wirkungskurve nach Lineweaver und Burk läßt vermuten, daß bei den durch AM 2 ausgelösten Kontrakturen (Abb.13b) ebenfalls ein kompetitiver Antagonismus zwischen Ca und Ip vorliegt, da auch hier die Geraden fast im selben Punkt die Ordinate

schneiden.

Aus den Schnittpunkten mit der Abszisse lassen sich die K_M -Werte berechnen. Daraus ergibt sich, daß in Gegenwart von 10^{-7} Mol/l Ip die $[Ca^{++}]_{e.c.}$ auf $1,39 \times 10^{-2}$ Mol/l erhöht werden muß, damit AM 2 denselben Kontraktionseffekt bewirkt wie in Abwesenheit von Ip. Hieraus läßt sich errechnen, daß in diesem Fall 1 Molekül Ip 136 000 Moleküle Ca antagonisieren kann, während es bei der durch AM 1 am selben Präparat ausgelösten Kontraktion nur 6 800 sind.

Der in Abb.11 abgebildete Versuch zeigt, daß der durch AM 2 ausgelöste Kontraktionseffekt spezifisch durch Ip gehemmt wird, wohingegen die durch AM 1 bewirkte Kontraktion fast gar nicht von Ip gehemmt wird.

Die Abhängigkeit der phasischen Kontraktionen (AM 1b) von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ und ihre Hemmbarkeit durch Ip wurde in 2 Versuchsreihen untersucht (Abb.8 und Abb.13a). Dabei ergab sich eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Ca^{++} -abhängigen Prozesse auf Ip. Wir errechneten bei den in Abb.8 dargestellten Versuchen, daß 1 Molekül Ip 10 000 Moleküle Ca antagonisieren kann im Vergleich zu 6 800 bei den in Abb.13a dargestellten Versuchen. Dieser Unterschied beruht nach unserer Meinung bei identischem Versuchsablauf auf der verlängerten Einwirkdauer der K_2SO_4 -Locke-Lösung bei den Versuchen in Abb.13a (15 Min.) gegenüber den in Abb.8 dargestellten Versuchen (1 Min.). Wir glauben, daß während des sehr lange dauernden tonischen Anteils der Kontraktion viel Ca aus dem ECR in die Muskelzelle geströmt ist und bei der nächsten pha-

sischen Kontraktion mitmobilisiert wird(vergleichbar dem stair-case Phänomen am Herzen [Reichel 1960]).

Die geringere Hemmbarkeit der phasischen Kontraktion weist darauf hin, daß AM 1 aus einem Kompartiment gespeist wird, das für den Ca-Antagonisten schlechter zugänglich ist als andere Kompartimente. Wenn man annimmt, daß die geringere Zugänglichkeit für Ca-Antagonisten eine größere räumliche Entfernung des Kompartimentes vom ECR widerspiegelt, dann liegt die Vermutung nahe, daß dieses Kompartiment mit Sarkolemm-fernen intrazellulären Speicherorten identisch ist, die Ca relativ fest binden.

1972 konnte Haeusler anhand seiner ebenfalls mit Hilfe des Ip durchgeführten Versuche zeigen, daß intrazellulär gebundenes Ca eine Rolle beim Kontraktionsvorgang der glatten Muskelzelle spielt und daß die Freisetzung dieses intrazellulär gebundenen Ca durch Ip kaum wirksam verhindert wird.

In bemerkenswertem Gegensatz zu der sehr geringen Abhängigkeit des AM 1 von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$, steht die viel größere Abhängigkeit des AM 2 von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ und seine große Empfindlichkeit gegenüber Ca-Antagonisten. AM 2 bedient sich also offensichtlich eines ECR-nahen Kompartimentes. Ob es sich bei diesem Kompartiment um den ECR selbst und/oder um locker an negative Membranladungen gebundenes Ca handelt, kann hier nicht entschieden werden.

Man darf aus diesem Verhalten schließen, daß die depolarisierte und zur Generierung von AP unfähige Membran

(AM 2) eine hohe Ca-Permeabilität besitzt, die es den extrazellulär lokalisierten Ca^{++} gestattet, die Membran zu permeieren und die kontraktile Filamente zu aktivieren.

Die physiologische Aktivierung (AM 1) durch AP dagegen erfolgt offenbar in viel stärkerem Maße durch eine Mobilisierung von Ca^{++} aus intrazellulären Speichern.

Edman et al. (1962) schlossen aus ihren Versuchen ebenfalls, daß im Augenblick der Erregung Ca^{++} aus einer gebundenen Form freigesetzt werden und Mayer et al. (1972) konnten zeigen, daß während spontaner AP-Salven nur eine kleine Menge von Ca^{++} in den ICR eindringt, die nicht ausreicht, den kontraktile Apparat zu aktivieren, sondern möglicherweise nur die Freisetzung von intrazellulär gebundenen Ca^{++} triggert.

Eine Temperaturerniedrigung bedeutet ganz allgemein, daß alle stoffwechselabhängigen Prozesse langsamer ablaufen. In unserem Fall heißt das, daß die Ca-Pumpe in ihrer Aktivität herabgesetzt wird. Daraus folgt, daß im ICR bei niedrigen Temperaturen mehr Ca sein muß als bei normaler Temperatur. Dies wurde auch von Bauer et al. (1965) und Tomita (1970) gefunden.

Evans et al. (1958) fanden bei ihren Temperaturversuchen bei einer Temperatursenkung eine gleichzeitige Erniedrigung sowohl des phasischen als auch des tonischen Anteils der Kontraktion, während andere (Pfaffmann et al. 1965, Godfraind et al. 1972) bei Temperaturerniedrigung lediglich eine Abnahme des tonischen Anteils der Kontraktion

beobachteten.

Unser in Abb.14 dargestellter Versuch, der bei Temperatursenkung eine Erhöhung des phasischen und eine Erniedrigung des tonischen Anteils zeigt, findet unserer Meinung nach folgende Erklärung:

der positiv inotrope Effekt auf den phasischen Teil der Kontraktion erklärt sich möglicherweise aus den bei niedrigen Temperaturen auftretenden verbreiterten AP (Riemer et al.1970), wie sie auch von Kaufmann et al.(1965) am Herzmuskel bei Temperaturerniedrigung gefunden wurden. Kaufmann et al. führten die daraus resultierende positive Inotropie auf verstärkten Ca-Einstrom bzw. Ca-Freisetzung während der verbreiterten AP zurück.

Während der tonischen Kontraktur konnten wir bei niedrigen Temperaturen ein langsames Ansteigen der Kontraktionskraft beobachten. Analog den Untersuchungen von Hasselbach et al.(1961) glauben auch wir, daß auf Grund verminderter Pumpenaktivität die Ca^{++} in geringerem Maße wie bei normaler Temperatur von den kontraktilelementen entfernt werden können.

Wenn den in tonischer Kontraktur verharrenden, durch K_2SO_4 -Locke depolarisierten Präparaten ACh oder Histamin verabreicht wird, kann eine Zusatzkontraktion erwirkt werden. Ihr muß eine weitere Erhöhung der $[Ca^{++}]_{i.c.}$ entsprechen (AM 3). Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, daß die Zusatzkontraktionen

- von der Konzentration der Agentien abhängig sind
(Abb. 16 und 17),
- mit sinkender Temperatur anwachsen (Abb.16),

- durch Ip in geringerem Maße hemmbar sind als die tonischen Kontraktionen (Abb.16),
- in sehr viel geringerem Maße von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ abhängig sind als der phasische und der tonische Teil der Kontraktion (Abb.18).

Bei einer quantitativen Analyse der durch diese Stimulanten induzierten Zusatzkontraktionen muß allerdings berücksichtigt werden, daß deren Amplituden kein exaktes Maß für den Zuwachs an $[Ca^{++}]_{i.c.}$ darstellen, da sie von verschiedenen tonischen Kontrakturrhöhen ausgehen. Je höher diese tonischen Kontraktionen sind, desto geringer werden die Zusatzkontraktionen trotz gleichen Zuwachses an $Ca^{++}_{i.c.}$ sein, da die Ca-Rezeptoren für die Aktivierung des kontraktile Apparates der Vollsättigung immer näher kommen.

Aus der Abb.18 ist aber klar ersichtlich, daß die Extrakontraktionen eine erstaunliche Unabhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ besonders bei kleinen $[Ca^{++}]$ aufweisen. Bei höheren $[Ca^{++}]_{e.c.}$ werden die Extrakontraktionen etwas kleiner wahrscheinlich auf Grund der eben erörterten gleichzeitigen Erhöhung der tonischen Kontraktur.

Die durch die verschiedenen AM induzierten Kontraktionen unterscheiden sich klar in ihrer Abhängigkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ und in ihrer Antagonisierbarkeit durch Ip. Sie nehmen dabei folgende Reihenfolge ein:

$$AM\ 2 > AM\ 1 > AM\ 3.$$

Wenn die Abhängigkeit der verschiedenen AM von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ und ihre Hemmbarkeit durch Ca-Antagonisten

die räumliche Entfernung der Kompartimente vom ECR widerspiegeln, deren sich die AM zur Erhöhung der $[Ca^{++}]_{i.c.}$ bedienen, dann aktiviert AM 2 ein Kompartiment, das dem ECR am nächsten liegt und AM 3 ein Kompartiment, das vom ECR am weitesten entfernt ist. Es liegt daher die Vermutung nahe anzunehmen, daß im Zustand des Depolarisationsblockes (AM 2) die Membran eine hohe Ca-Permeabilität besitzt, die eine rasche Angleichung der $[Ca^{++}]_{i.c.}$ an die $[Ca^{++}]_{e.c.}$ ermöglicht und eine effektive Reduktion der $[Ca^{++}]_{i.c.}$ durch Bindung an Speicherorte oder aktiven Rücktransport durch die Membran verhindert.

Diese Auffassung steht in guter Übereinstimmung mit Befunden, daß Zellen der *Taenia coli* in einem depolarisierenden Medium große Mengen von Ca^{++} aufnehmen (Chujyo et al.1963, Urakawa et al.1964).

Die an depolarisierten Zellen durch Stimulantien wie ACh und Histamin ausgelösten Zusatzkontraktionen scheinen dagegen die Folge einer Freisetzung von an intrazelluläre Speicherorte gebundenen Ca^{++} zu sein.

Edman et al.(1962) glauben ebenfalls an eine Freisetzung gebundener Ca^{++} durch ACh, da sie folgende Verhaltensweisen ihrer Präparate feststellen konnten:

1. Abnahme der ACh-Kontraktion in Ca-freier Lösung war zu langsam für eine reine Diffusion,
2. wiederholte ACh-Reizung in rascher Folge beschleunigte die Abnahme der ACh-Kontraktion (Erschöpfung eines Pools),
3. der ACh-Effekt konnte nicht durch eine Erhöhung der

$[Ca^{++}]_{e.c.}$ imitiert werden.

Der physiologische Aktivierungsmechanismus (AM 1), bei dem die Kontraktion an die AP-Frequenzaktivität der Membran angekoppelt ist, steht in seiner Empfindlichkeit von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ zwischen AM 3 und AM 2. Im Gegensatz zu AM 3 treten Kontraktionen ausgelöst durch AM 1 nur bei einer $[Ca^{++}]_{e.c.}$ größer als ca. 5×10^{-5} Mol/l (Schwellenkonzentration) auf. Für die Funktion dieses AM ist also eine gewisse Mindestmenge von Ca^{++} essenziell. Diese Beobachtung steht in Übereinklang mit Befunden, die die Abhängigkeit des ionalen Spike-Mechanismus von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ an der *Taenia coli* betonen (Brading et al. 1969). Trotzdem sind die durch den physiologischen AM hervorgerufenen Kontraktionen deutlich weniger von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ abhängig als die durch AM 2 induzierten Kontraktionen. Dies weist darauf hin, daß nur ein Teil der die Kontraktion aktivierenden $Ca^{++}_{i.c.}$ dem ECR entstammt. Diese Befunde stützen die Ergebnisse von Mayer et al. (1972), daß während der AP-Phase nur sehr wenige $Ca^{++}_{e.c.}$ die Membran permeieren. Die erforderliche Erhöhung der $[Ca^{++}]_{i.c.}$ würde dann zum kleineren Teil durch permeierende Ca^{++} bewirkt, zum größeren Teil durch Ca^{++} , die aus intrazellulären Speichern freigesetzt worden sind. Die Funktion der den Aktionsstrom tragenden Ca^{++} wäre dann weniger, direkt Aktivatorsubstanz für die Aktivierung der kontraktilen Elemente als vielmehr Trigger für die Freisetzung von intrazellulär gebundenem Ca zu sein.

Zusammenfassung

Das kontraktile System der glatten Muskelzellen der Taenia coli vom Meerschweinchen kann durch mindestens drei verschiedene Mechanismen aktiviert werden:

- 1.) Aktivierung durch Aktionspotentiale
(= Aktivierungsmechanismus 1)
- 2.) Aktivierung durch Membrandepolarisation ohne Generierung von AP (= AM 2)
- 3.) Aktivierung durch direkten pharmakologischen Angriff von Pharmaka ohne sichtbare Wirkung auf elektrische Membranphänomene
(= AM 3 = pharmako-mechanische Koppelung)

Es wurde angenommen, daß die Aktivierung des kontraktilen Systems stets eine Erhöhung der $[Ca^{++}]_{i.c.}$ voraussetzt, sich die Aktivierungsmechanismen aber durch die Freisetzung der hierzu benötigten Ca^{++} aus verschiedenen Kompartimenten unterscheiden. Daher wurde die Abhängigkeit der durch die drei Aktivierungsmechanismen induzierten isometrischen Kontraktionen von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$, sowie der Hemmbarkeit durch den Ca-Antagonisten "Iproveratril" untersucht.

Der phasische Teil der Kontraktion, die durch rasche Erhöhung der $[K^+]_{e.c.}$ induziert wurde, war dabei ein Maß für den Aktivierungsgrad des Mechanismus 1, der darauf folgende tonische Teil für den Aktivierungsgrad des Mechanismus 2. Durch Gabe von ACh bzw. Histamin zu einem in tonischer Kontraktur befind-

lichen Präparat wurde der Mechanismus 3 aktiviert.

Die durch die verschiedenen AM induzierten Kontraktionen sind von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ nicht in gleicher Weise abhängig. Die Ca-Empfindlichkeit nimmt vielmehr in folgender Reihenfolge ab:

$$AM\ 2 > AM\ 1 > AM\ 3.$$

In gleicher Reihenfolge geht die Antagonisierbarkeit durch Iproveratril zurück.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die drei untersuchten AM die Erhöhung der $[Ca^{++}]_{i.c.}$ aus Ca-Kompartimenten speisen, die sich in ihrer Zugänglichkeit vom ECR unterscheiden und daher von diesem in unterschiedlichem Maße abhängig sind.

Die hohe Empfindlichkeit des AM 2 von der $[Ca^{++}]$ und der Anwesenheit von Iproveratril im ECR läßt vermuten, daß AM 2 ein Kompartiment aktiviert, das dem ECR am nächsten liegt. Daraus folgt, daß die Depolarisationskontraktur (AM 2) bei hoher Membranpermeabilität durch $Ca^{++}_{e.c.}$ gespeist wird.

AM 3 (pharmako-mechanische Koppelung) aktiviert demnach ein Kompartiment, das am weitesten vom ECR entfernt liegt. Man kann annehmen, daß es sich dabei um Sarkolemm-ferne i.c. Speicherorte handelt, die Ca relativ fest binden. Diese i.c. Speicherorte können durch direkten Angriff von erregenden Pharmaka das Ca freisetzen.

Der physiologische AM 1, bei dem die Kontraktion an die AP-Frequenzaktivität der Membran angekoppelt

ist, steht in seiner Empfindlichkeit von der extrazellulären $[Ca^{++}]$ zwischen AM 2 und AM 3. Für AM 1 ist im Gegensatz zu AM 3 eine gewisse Mindestmenge an $Ca^{++}_{e.c.}$ essentiell. Trotzdem sind die durch AM 1 hervorgerufenen Kontraktionen deutlich weniger von der $[Ca^{++}]_{e.c.}$ abhängig als AM 2. Dies würde bedeuten, daß die erforderliche Erhöhung der $[Ca^{++}]_{i.c.}$ zum kleineren Teil durch permeierende Ca^{++} zum größeren Teil durch Ca^{++} bewirkt wird, die aus i.c. Speichern freigesetzt worden sind.

Ich danke Herrn Priv.Doiz.Dr.med.G.Ulbrecht für die Überlassung des Themas sowie seine konstruktiven Kritiken bei Durchsicht der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.med.J.Riemer, der mir in beispielhafter Weise jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Literaturverzeichnis

Axelsson, J., Wahlström, B., Johansson, B.,

Jonsson, O.

Influence of the ionic environment on spontaneous electrical and mechanical activity of the rat portal vein

Circulation Res. 21, 609-618 (1967)

Axelsson, J.

Mechanical properties of smooth muscle, and the relationship between mechanical and electrical activity

In: Smooth Muscle, edited by E. Bülbring

A.F. Brading, A.W. Jones and T. Tomita

London (1970)

Bauer, H., Goodford, P.J., Hüter, J.

The calcium content and ⁴⁵calcium uptake of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli

J.Physiol. 176, 163-179 (1965)

Biamino, G., Johansson, B.

Effects of calcium and sodium on contracture tension in the smooth muscle of the rat portal vein

Pflügers Arch. 321, 143-158 (1970)

Bozler, E.

Conduction, automaticity and tonus of
visceral muscles

Experientia 4, 213-218 (1948)

Brading, A.F.

Osmotic phenomena in smooth muscle

In: Smooth Muscle, edited by E. Bülbring
A.F. Brading, A.W. Jones and T. Tomita
London (1970)

Brading, A.F., Bülbring, E., Tomita, T.

The effect of sodium on the action potential
of the smooth muscle of the guinea-pig taenia
coli

J. Physiol. 200, 637-654 (1969)

v. Breemen, C., Daniel, E.E.

The influence of high potassium depolariza-
tion and acetylcholine on calcium exchange
in the rat uterus

J. Gen. Physiol. 49, 1299-1317 (1966)

Bülbring, E.

Correlation between membrane potential, spike
discharge and tension in smooth muscle

J. Physiol. 128, 200-221 (1955)

Burnstock, G.

Structure of smooth muscle and its innervation

In: Smooth Muscle, edited by E. Bülbring
A.F. Brading, A.W. Jones and T. Tomita
London (1970)

Casteels, R.

The relation between the membrane potential
and the ion distribution in smooth muscle
cells

In: Smooth Muscle edited by E. Bülbbring
A.F. Brading, A.W. Jones and T. Tomita
London (1970)

Chujyo, N., Holland, W.C.

Potassium-induced contracture and calcium
exchange in the guinea pig's taenia coli
Am.J.Physiol. 205, 94-100 (1963)

Collins, G., Sutter, M.C., Teiser, J.C.

Calcium and contraction in the rabbit an=
terior mesenteric-portal vein
Can.J.Physiol.Pharmacol. 50(4), 289-299 (1972)

Collins, G., Sutter, M.C., Teiser, J.C.

The effects of manganese on the rabbit an=
terior mesenteric-portal vein
Can.J.Physiol.Pharmacol. 50(4), 300-309 (1972)

Durbin, R.P., Jenkinson, D.H.

The effect of carbachol on the permeability
of depolarized smooth muscle to inorganic ions
J.Physiol. 157, 74-89 (1961)

Durbin, R.P., Jenkinson, D.H.

The calcium dependence of tension develop=
ment in depolarized smooth muscle
J.Physiol. 157, 90-96 (1961)

Edman, K.A.P., Schild, H.O.

Interactions of acetylcholine, adrenaline
and magnesium with calcium in the contrac=
tion of depolarized rat uterus
J.Physiol. 155, P10-11 (1961)

Edman, K.A.P., Schild, H.O.

The need for calcium in the contractile
responses induced by acetylcholine and po=
tassium in the rat uterus
J.Physiol. 161, 424-441 (1962)

Evans, D.H.L., Schild, H.O.

Mechanism of contraction of smooth muscle
by drugs
Nature 180, 341-342 (1957)

Evans, D.H.L., Schild, H.O., Thesleff, S.

Effects of drugs on depolarized plain muscle
J.Physiol. 143, 474-485 (1958)

Fleckenstein, A.

Experimentelle Pathologie der akuten und
und chronischen Herzinsuffizienz
In: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft
für Kreislaufforschung, Herzdilatation
und Insuffizienz
34. Tagung S.15-34 (1968)

Godfraind, T., Kaba, A.

The role of calcium in the action of drugs
on vascular smooth muscle
Arch.int.Pharmacodyn.et Thér. 196, 35-49 (1972)

Golenhoven, K., Lammel, E.

Selective suppressions of some components
of spontaneous activity in various types of
smooth muscle by Iproveratril (Verapamil)
Pflügers Arch. 331, 233-243 (1972)

Haas, H., Härtfelder, G.

α -Isopropyl- α -[(N-methyl-N-homoveratryl)- γ -
aminopropyl]-3,4-dimethoxyphenyl-acetonitril,
eine Substanz mit coronarerweiternden Eigen=
schaften

Arzneim.Forsch.(Drug Res.) 12, 549-558 (1962)

Haeusler, G.

Differential effect of verapamil on exci=
tation-contraction coupling in smooth muscle
and on excitation-secretion coupling in
adrenergic nerve terminals

J.Pharmacol.Exp.Ther. 180, 672-682 (1972)

Hasselbach, W.

Die Ca-Pumpe der "Erschlaffungsgrana" des
Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP=
Spaltung

Biochem.Z. 33, 518-528 (1961)

Hasselbach, W.

Muskel

In: Physiologie des Menschen(hrsg. von Gauer,
Kramer,Jung)

Urban-Schwarzenberg-Verlag (1971)

Hurwitz, L., Joiner, P.D.

Mobilization of cellular calcium for contraction in intestinal smooth muscle

Am.J.Physiol. 218, 12-19 (1970)

Hurwitz, L., Suria, A.

The link between agonist action and response in smooth muscle

Am.Rev. of Pharmacol. 11, 303-326 (1971)

Huxley, H.E.

Molecular basis of contraction in cross-striated muscles

In: The Structure And Function Of Muscle
Vol. I

Edited by G.H. Bourne

Academic Press New-York and London (1972)

Imai, S., Takeda, K.

Effects of vasodilators on the isolated taenia coli of the guinea-pig

Nature 213, 509-511 (1967)

Imai, S., Takeda, K.

Actions of calcium and certain multivalent cations on potassium contracture of guinea-pig's taenia coli

J.Physiol. 190, 155-169 (1967)

Kaufmann, R., Fleckenstein, A.

Die Bedeutung der Aktionspotential-Dauer
und der Ca^{++} -Ionen beim Zustandekommen der
positiv-inotropen Kältewirkungen am Warm=
blüter-Myokard

Pflügers Arch. 285, 1-18 (1965)

Krebs, H.A., Henseleit, K.

Untersuchungen über die Harnstoffbildung
am Tierkörper

Hoppe-Seyl.Z. 210, 33-66 (1932)

v.Loh, D., Golenhoven, K.

Temperatureinflüsse auf die Spontanaktivität
der isolierten Taenia coli vom Meerschwein=
chen

Pflügers Arch. 318, 35-50 (1970)

Lüllmann, H.

Calcium fluxes and calcium distribution
in smooth muscle

In: Smooth Muscle, edited by E. Bülbring

A.F. Brading, A.W. Jones and T. Tomita

London 1970

Magaribuchi, T., Ohbu, T., Sakamoto, Y., Yamamoto, Y.

Some electrical properties of the slow po=
tential changes recorded from the guinea pig
stomach in relation to drug actions

Jap.J.Physiol. 22, 333-352 (1972)

Mayer, C.J., van Breemen, C., Casteels, R.

The action of Lanthanum and D 600 on the
calcium exchange in the smooth muscle cells
of the guinea-pig taenia coli
Pflügers Arch. 337, 333-350 (1972)

Niedergerke, R.

Movements of calcium in frog heart ventricles
at rest and during contractures
J.Physiol. 167, 515-550 (1963)

Peiper, U., Griebel, L., Wende, W.

Activation of vascular smooth muscle of the
rat aorta by noradrenaline and depolariza-
tion: two different mechanisms
Pflügers Arch. 330, 74-89 (1971)

Pfaffmann, M., Urakawa, N., Holland, W.C.

Role of metabolism in K-induced tension
changes in guinea-pig taenia coli
Am.J.Physiol. 208, 1203-1205 (1965)

Reichel, H.

Muskelphysiologie
Springer Verlag
Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960)

Riemer, J., Mayer, C.J., Ulbrecht, G.

Der Temperatureinfluß auf die spontane elek-
trische Aktivität der Taenia coli des Meer-
schweinchens
Pflügers Arch. 319, R120-121 (1970)

Riemer, J., Mayer, C.J., Ulbrecht, G.

Competitive antagonizable effects of calcium
on the isolated taenia coli of guinea-pig
Pflügers Arch. 332, R151 (1972)

Riemer, J., Mayer, C.J., Ulbrecht, G.

Evidence for direct and indirect effects of
 Ca^{++} on pacemaker activity of isolated
taenia coli of guinea-pig
Pflügers Arch. 339, R61 (1973)

Tomita, T.

Electrical properties of mammalian smooth
muscle
In: Smooth Muscle, edited by E. Bülbring
A.F. Brading, A.W. Jones and T. Tomita
London (1970)

Tritthart, H., Kaufmann, R., Volkmer, H.-P.,

Bayer, R., Krause, H.
Ca-movement controlling myocardial contracti-
lity
Pflügers Arch. 338, 207-231 (1973)

Urakawa, N., Holland, W.C.

Ca^{45} uptake and tissue calcium in K-induced
phasic and tonic contraction in taenia coli
Am.J.Physiol. 207, 873-876 (1964)

Zelck, U., Jonas, L., Wiegershausen, B.

Ultrahistochemischer Nachweis von Calcium
in glatten Muskelzellen der Arteria coronaria
sinistra des Schweins
Acta histochem. Bd. 44, 180-182 (1972)

Lebenslauf

Ich wurde am 29.10.1948 als zweiter Sohn des damaligen Volksschullehrers Konrad Dörfler und seiner Ehefrau Charlotte in Homberg/Bez. Kassel geboren.

In Homberg verbrachte ich Kindheit und Schulzeit. Nach insgesamt 12,5 Jahren Schulbesuch legte ich im Sommer 1967 das Abitur ab.

Im Oktober desselben Jahres wurde ich zur Bundeswehr eingezogen. Ich hatte mich zum verkürzten Grundwehrdienst (12 Monate) gemeldet. Meine Bundeswehrzeit verbrachte ich in Marburg und München.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich an der Universität Gießen das Studium der Humanmedizin. Nach 5 Semestern schloß ich dort mit dem Physikum den vorklinischen Teil des Studiums ab. Das sich anschließende Sommersemester (1971) verbrachte ich an der Universität Wien. Bis zur Beendigung meines Studiums mit dem Staatsexamen im Sommer 1974 studierte ich an der Universität München.

